

VISIT...

LANZAROTE
Caliente.COM

C. R. H.
GLYCOPROTEINS

R. C. Hughes

Medical Research Council National Institute
for Medical Research Mill Hill, London

**LONDON NEW YORK
CHAPMAN AND HALL**

Р.Хьюз

Гликопротеины

Перевод с английского
Н. Д. Габриэлян

Москва «Мир» 1985

ББК 28.902
X 98
УДК 577.112

Хьюз Р.

X 98 Гликопротеины: Пер. с англ. — М.: Мир, 1985. — 140 с., ил.

Книга английского автора посвящена особому классу белков — гликопротеинам, играющим важную роль в функциях живой клетки, в частности в механизмах иммунитета. Рассмотрены структура и биосинтез гликопротеинов, их распад, транспорт в клетке и биологическое значение.

Предназначена для биохимиков, биологов смежных областей, для студентов биологических, медицинских и химических вузов.

X $\frac{2001040000-044}{041(01)-85}$ 131—85, ч. I

ББК 28.902
591.4

Редакция литературы по биологии

© 1983 R. C. Hughes

© Перевод на русский язык, «Мир», 1985

От переводчика

Интерес к структуре и функции гликопротеинов значительно возрос в последние годы в связи с установлением роли этих макромолекул в различных функциях мембран. Так, показано, что гликопротеины участвуют в связывании различных биорегуляторов на поверхности клеток, в межклеточных взаимодействиях, в транспорте и циркуляции макромолекул.

В книге, предлагаемой вниманию советского читателя, изложены последние достижения в изучении строения, биосинтеза и биологической функции гликопротеинов. Автор книги критически рассматривает имеющиеся в настоящее время данные и дает достаточно полное представление о методах исследования этого класса соединений. При обсуждении основных этапов биосинтеза углеводных цепей гликопротеинов перечисляется ряд пока еще не решенных проблем. Это — биосинтез сложных структур олигосахаридов, содержащих остатки маннозы, образование множественных разветвлений N-гликанов, регуляция биосинтеза O-гликанов. При рассмотрении функции гликопротеинов особое внимание уделяется роли углеводных структур в транспорте этих соединений в кровяном русле и внутри клетки. Подробно рассматриваются механизмы межклеточных взаимодействий и адгезии. Нарушение функции гликопротеинов, возникающее при канцерогенезе, упоминается в книге только среди проблем, ждущих своего решения.

Книга Р. Хьюза является весьма полезным и полным по объему информации руководством как для специалистов в области биохимии, молекулярной биологии, биорганической химии и иммунохимии, так и для аспирантов соответствующих специальностей. Она может быть использована также студентами старших курсов биологических факультетов университетов и медицинских институтов. В Советском Союзе последней монографией на эту тему было двухтомное руководство «Гликопротеины», вышедшее в переводе с английского языка в издательстве «Мир» в 1969 г. Данная книга послужит необходимым и своевременным дополнением к имеющейся литературе.

Благодарности

Я приношу благодарность следующим своим друзьям и коллегам за многочисленные полезные советы, полученные мною в ходе подготовки этой книги: N. Carter, M. Fukuda, P. Gleeson, H. Schachter и N. Sharon. Своими советами они помогли значительно улучшить книгу, однако один лишь автор несет полную ответственность за окончательный текст, вышедший в свет.

1. Введение

Гликопротеинами называют белки, к определенным аминокислотным остаткам которых присоединены олигосахаридные цепи. О гликопротеинах известно уже довольно давно; предполагается, что эти белки выполняют важные биологические функции [1—3]. Автор надеется, что, прочтя данную книгу, читатель сможет убедиться в правильности этого утверждения.

Термином «олигосахарид» обычно обозначается углеводный полимер, построенный из 2—10 моносахаридных остатков. В природе существует очень большое разнообразие моносахаридов. Наиболее распространенными остатками является D-глюкоза, три формулы которой приведены на рис. 1.1. Моносахариды различаются по длине углеродной цепи, по числу гидроксильных или других эквивалентных групп (например, аминогрупп), а также по расположению гидроксильных групп и атомов водорода относительно центральной оси. Структура *открытой* шестиуглеродной цепи (рис. 1.1.) — это лишь теоретическая формула. На самом же деле моносахариды существуют лишь как циклические структуры с 5 или 6 атомами в кольце, причем один из них является кислородом. Каждый моносахарид находится обычно лишь в одной определенной циклической форме. Например, глюкоза существует в виде шестичленной циклической *пиранозной формы* (рис. 1.1), причем в растворе ее молекула принимает предпочтительную конформацию, так называемую *конформацию кресла* (рис. 1.1). Что же касается конформации моносахаридных остатков в составе молекулы гликопротеинов, то в этом вопросе еще много неясного. Следует, однако, учитывать, что углеводные

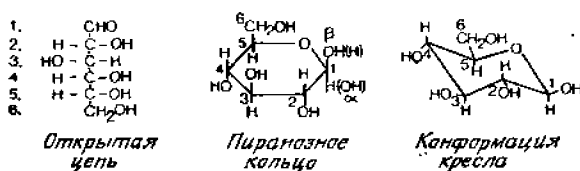


Рис. 1.1. Структурные формулы глюкозы.

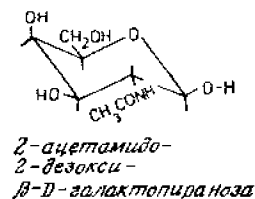
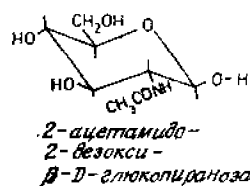
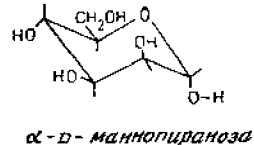
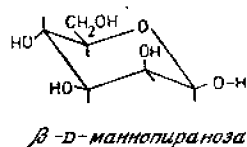
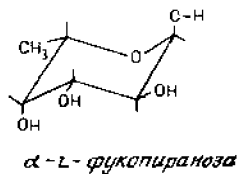
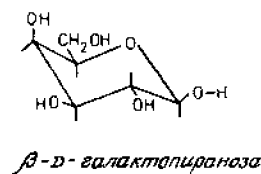
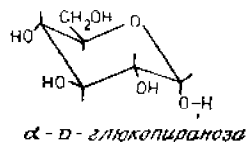
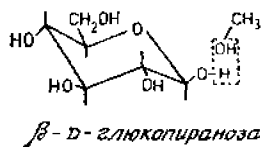


Рис. 1.2. Структура циклических моносахаридов, входящих в состав олигосахаридов гликопротеинов. Атомы водорода для простоты изображения не показаны. Структура нейрамных кислот приведена на рис. 2.3. На примере β -D-глюкопиранозы показано образование (метил)гликозида.

цепи гликопротеинов обладают определенной трехмерной структурой, а это имеет крайне важное значение для полного выяснения строения, обмена и функции этих молекул [4]. В олигосахаридных цепях циклические моносахариды связаны друг с другом ковалентными связями.

Они возникают при реакции гидроксильной группы при C-1 с любой гидроксильной группой (кроме той, которая находится при C-1) второго моносахарида, сопровождающейся выделением молекулы воды. Эта реакция полностью аналогична образованию гликозида, например метилгликозида, и может повторяться с вовлечением любого числа моносахаридов. Конфигурация при C-1 может варьировать, что приводит к образованию α - или β -гликозидных связей.

Как будет показано в дальнейшем, размеры углеводной цепи гликопротеинов колеблются от дисахаридного звена до очень сложных структур, содержащих 18 моносахаридов или даже более. Строго говоря, длинные углеводные цепи следует называть полисахаридами или *гликанами*. Последнее обозначение употребляется весьма часто; например, можно сказать «гликаны овальбумина». Молекулы некоторых белков, например коллагена и белков секрета подчелюстной железы, содержат лишь дисахаридные звенья, тогда как углеводные цепи или гликаны других гликопротеинов построены из нескольких моносахаридов и иногда включают до семи разных остатков (табл. 1.1). Гликаны имеют очень разветвленную структуру, подобную дереву с относительно жестким стволом и несколькими ответвлениями, которые могут обладать большой конформационной подвижностью. Самое важное, однако, это сложность строения длинных гликанов гликопротеинов: в их структуре не удается выявить какой-либо периодичности. Строение «истинных» (собственно) полисахаридов, например целлюлозы, сильно отличается от такового гликанов гликопротеинов. Обычно в их составе имеется лишь небольшой набор разных моносахаридов (часто всего лишь какой-то один моносахарид; в целлюлозе, например, только глюкоза), и существует определенная повторяющаяся последовательность моносахаридов, связанных друг с другом характерными гликозидными связями, например в целлюлозе $\beta 1 \rightarrow 4$. Такие гликаны обычно гораздо длиннее, чем гликаны гликопротеинов. Тем не менее такое довольно искусственное разделение между собственно полисахаридами и углеводными цепями гликопротеинов изживает себя. Прежде всего стало ясно, что ранее рас-

Таблица 1.1. Гликопротеины, протеогликаны и гликолипиды

Наиболее распространенные моносахариды ¹	Дополнительные компоненты		Локализация
	обычные	редкие	
<i>В гликопротеинах</i>			
Глюкоза Галактоза Манноза Глюкозамин ² Галактозамин ² Нейраминовая кислота ² Фукоза	Белок	Фосфат Сульфат	Секреты Мембраны клеток Внеклеточный матрикс и соединительная ткань
<i>В протеогликах</i>			
Галактоза Ксилоза Глюкуроновая кислота Идуроновая кислота Глюкозамин ² Галактозамин ²	Сульфат Белок		Внеклеточный матрикс и соединительная ткань
<i>В гликолипидах</i>			
Глюкоза Галактоза Глюкозамин ² Галактозамин ² Нейраминовая кислота ² Фукоза	Церамид	Сульфат	Мембраны клеток Минорные компоненты плазмы

¹ Для обозначения соответствующих моносахаридов ниже будут использованы следующие сокращения: глюкоза (glc, G), манноза (man, M), фукоза (fuc, F), галактоза (gal, Ga), N-ацетилглюкозамин (gicNAc, Gn), N-ацетилгалактозамин (galNAc, Gan), N-ацетилнейраминовая кислота (neuNAc, Sa, N)

² Всегда N-ацетилглюкозамин.

смаатривавшиеся как «истинные» полисахариды соединения (например, крахмал, гликоген или гепарин) с типичной повторяющейся структурой синтезируются на белковых молекулах; иначе говоря, они начинают свою

жизнь в составе гликопротеинов. Другими представителями такого типа соединений являются кислые полисахариды соединительных тканей, например хондроитинсульфаты, дерматансульфат и гепарансульфат. Все эти полисахариды прочно связаны с белком, и их следует рассматривать как особый тип гликопротеинов. Они обычно называются *протеогликанами*; ниже эти вещества соединительной ткани именно так и будут обозначаться. Наконец, для полноты изложения следует упомянуть, что олигосахариды, сходные с теми, которые имеются в гликопротеинах, могут также быть соединены с таким липидом, как керамид. Детальное описание свойств таких гликолипидов здесь не приводится, однако необходимо отметить, что эти специфические *гликолипиды* являются очень важными компонентами клеточных мембран. Функция и обмен сахаров, связанных с керамидом, часто аналогичны таковым для олигосахаридов гликопротеинов. Это сходство будет рассматриваться в соответствующих разделах данной книги.

Все три класса сложных углеводов — гликопротеины, протеогликаны и гликолипиды (табл. 1.1) — иногда в совокупности обозначают термином *гликоконъюгаты*.

Для обозначения сложных углеводов последовательностей гликанов в данной книге принята сокращенная номенклатура. Во-первых, обсуждаемые моносахаридные остатки гликопротеинов всегда находятся в пиранозной форме и, за исключением L-фукозы, в D-конфигурации (рис. 1.2). Во-вторых, хотя в гликанах обычно встречаются как α -, так и β -формы, существует определенное единообразие структуры, а в некоторых случаях аномерная конфигурация моносахаридных элементов может и не упоминаться, причем ясность изложения при этом не теряется. Используемые в книге сокращенные обозначения моносахаридов приведены в примечании к табл. 1.1.

2. Строение

2.1. Связи углеводов с белком

Моно- и олигосахариды присоединяются лишь к немногим боковым цепям аминокислотных остатков белков (табл. 2.1). Чаще всего в образовании связи участвуют

Таблица 2.1. Аминокислоты, с которыми связаны гликаны гликопротеинов

Аминокислота	Функциональная группа	Образованная связь	Связанный сахар	Наличие в глико-протеинах	Гликан
Аспарагин	Амидная	Гликозил-аминовая	glcNAc	Есть	N
Глутаминовая кислота	Карбоксильная	Эфирная		Нет	
Аспарагиновая кислота	»	»		»	
Серин	Гидроксильная	Гликозидная	galNAc	Есть	O
Треонин	»	»	man	»	O
Гидроксилизин	»	»	gal	»	O
Гидроксипролин	»	»	gal	»	O
Цистеин	Сульфгидрильная	Тиогликозидная	ara ¹ , gal	Нет (?)	O

¹ ara — L-арабиноза.

C-1 N-ацетилглюкозамина и амидная группа аспарагина. Возникающая при этом структура (рис. 2.1) представляет собой 2-ацетамидо-N-(L-аспарт-4-оил)-2-дезоксиг-β-D-глюкопиранозиламин (тривиальное обозначение «аспарагинил-N-ацетилглюкозамин» или glcNAcAsn). Аспарагин входит в состав длинной полипептидной цепи, а к остатку N-ацетилглюкозамина прикрепляются другие моносахариды.

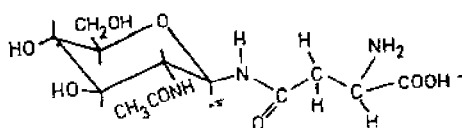


Рис. 2.1. Связь между N-ацетилглюкозамином и аспарагином. Атомы водорода углеводного кольца для простоты изображения не показаны.

Углеводные цепи, присоединенные таким путем к полипептиду, обозначаются как N-гликаны. При другом варианте связи сахара прикрепляются через C-1 гликозидной связью к гидроксильрованным боковым цепям серина, треонина, гидроксизина или гидроксипролина. Последние аминокислоты обычно встречаются в растениях, причем в гликопротеинах растений наиболее распространена связь, в которой L-арабиноза прикрепляется гликозидной связью к гидроксипролину [5]. В некоторых растительных гликопротеинах к гидроксипролину может присоединяться также и D-галактоза, однако в других случаях такой связи не было обнаружено. Гидроксизин входит в состав коллагенов позвоночных и беспозвоночных; к этому остатку также прикрепляется D-галактоза с помощью β -гликозидной связи. К полипептидному остову коллагена присоединен также дисахарид 2-0- α -D-глюкопиранозил-D-галактоза ($\text{glc}\alpha 1 \rightarrow 2\text{gal}$) (рис. 2.2, Б).

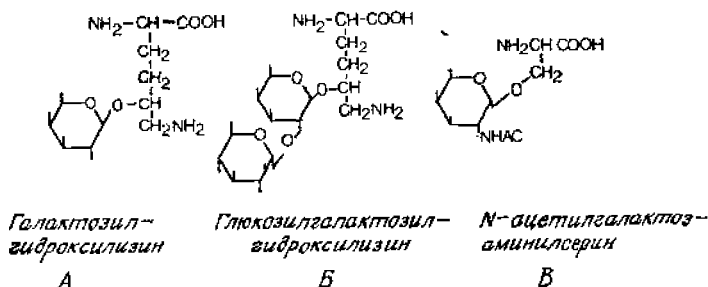


Рис. 2.2. Структура связей в О-гликанах. На схеме показана лишь конфигурация неводородных замещающих групп углеводного кольца.

В эктенсине — растительном гликопротеине — к серину прикреплен остаток галактозы. Сходная связь обнаружена у некоторых коллагенов, например выделенных из примитивных червей *Lumbricus* и *Nereis*. Дрожжи и плесени синтезируют гликопротеины, в которых углеводные цепи связаны через маннозу с остатком серина и треонина. Такие же связи найдены недавно в минорных компонентах гликопротеинов млекопитающих [6]. Однако у высших организмов распространены гликопротеины, в которых остатком, связанным с серином и треонином, является N-ацетилгалактозамин (рис. 2.2, В). Такие углеводные цепи называют О-гликанами, и тривиальное название соответствующей связи — «связь типа galNAcser (Thr)».

2.2. Определение последовательности

Только в редких случаях к полипептидному остову гликопротеина прикрепляется лишь одна определенная углеводная цепь. Обычно гликозилируется несколько аминокислотных остатков, и к каждому из таких гликозилированных остатков может присоединяться несколько очень сходных гликанов. С помощью протеолиза можно отделить эти гликаны, прикрепленные к связующим аминокислотам или небольшим пептидам. Затем полученные гликопептиды разделяют и определяют их моносахаридный состав, причем часто удается установить полную последовательность углеводов [7] сочетанием различных химических, ферментативных и физических методов (табл. 2.2).

Таблица 2.2. Этапы определения последовательности сахаров гликанов

1. Протеолиз: проназа, трипсин, химотрипсин, коллагеназа и т. п.
2. Разделение гликопептидов: гель-фильтрация, ионообменная хроматография, электрофорез и хроматография на бумаге
3. Состав: газово-жидкостная хроматография (моновосахариды), ионообменная хроматография (аминокислоты)
4. Определение последовательности сахаров:
 - а) химически: метилирование, окисление иодной кислотой
 - б) ферментативно: экзо- и эндогликозидазы
 - в) физически: масс-спектрометрия, ядерный магнитный резонанс

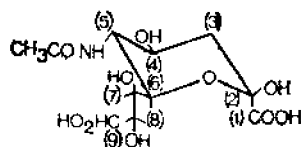


Рис. 2.3. Строение N-ацетилнейраминовой кислоты и других сиаловых кислот.

Название	Место замещения	Замещающая группа	Типичный источник
N-ацетилнейраминовая кислота	C-5	$\text{CH}_3\text{CONH}-$	Обычный
N-гликолилнейраминовая кислота	C-5	$\text{HOCH}_2\text{CONH}-$	Ткани свиньи (>90%)
O-ацетилпроизводные	C-9	$\text{CH}_3\text{CO}-$	Подчелюстная железа быка (редко)
	C-7	$\text{CH}_3\text{CO}-$	Ткани лошади
	C-4	$\text{CH}_3\text{CO}-$	

Идентификация *сиаловых кислот*, входящих в состав гликопротеинов, представляет собой особую проблему для анализа, поскольку основная кольцевая структура нейраминовой кислоты обнаруживается во многих вариантах, различающихся по положению замещающих групп. Наиболее часто встречающимся производным является N-ацетилнейраминовая кислота (рис. 2.3); кроме того, известно еще около 20 других производных сиаловой кислоты. N-гликолилнейраминовая кислота, например, часто встречается в гликопротеинах или гликолипидах; известны также несколько O-ацильных производных этой и N-ацетилнейраминовой кислот. В образовании гликозидной связи принимает участие гидроксильная группа при C-2.

2.2.1. Ферментативный анализ

Ферменты, метаболизирующие сложные углеводы, служат очень ценным инструментом при структурных

исследованиях, поскольку такие ферменты часто обладают весьма узкой специфичностью. В настоящее время чаще всего применяются *гликозидазы* [8], многие из которых получены в очищенном виде (табл. 2.3). Список гликозидаз, приведенный в табл. 2.3, не является исчерпывающим и не включает очень важного класса *эндо-*

Таблица 2.3. Экзогликозидазы, используемые для определения моносахаридной последовательности

Гликозидазы	Источник	Специфичность расщепляемых связей
Нейраминидаза	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	NeuNAc $\alpha 2 \rightarrow 3(6) gal$;
	<i>Clostridium perfringens</i>	NeuNAc $\alpha 2 \rightarrow$ $\rightarrow 6 glcNAc$
	<i>Vibrio cholerae</i>	NeuNAc $\alpha 2 \rightarrow 3 gal \gg$ $\gg \alpha 2 \rightarrow 6$
β -Галактозидаза	Вирус гриппа	NeuNAc $\alpha 2 \rightarrow 3 gal$
	<i>Arthrobacter ureafaciens</i>	Как у <i>Clostridium perfringens</i>
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Только Gal $\beta 1 \rightarrow$ $\rightarrow 4 glcNAc$
β -Маннозидаза	<i>Clostridium perfringens</i>	Gal $\beta 1 \rightarrow 4 glcNAc \gg$ $\gg \beta 1 \rightarrow 3$
	Мука бобов канавалин	
	<i>Aspergillus niger</i>	Не определены
α -Маннозидаза	Яйцевод кур	
	<i>Turbo cornutus</i>	
	Улитка	
α -Фукозидаза	Ананас	ман $\alpha 1 \rightarrow 2$ ман
	Мука бобов канавалин	$\alpha 1 \rightarrow 6 \gg \alpha 1 \rightarrow 3$
	<i>Aspergillus niger</i>	Только Fuc $\alpha 1 \rightarrow 2 gal$
β -N-ацетилглюкозаминидаза	<i>Clostridium perfringens</i>	Только Fuc $\alpha 1 \rightarrow 2 gal$
	<i>Aspergillus niger</i>	Все известные фуко- зильные связи
	<i>Bacillus fulminans</i>	
	<i>Turbo cornutus</i>	
	<i>Charania lampas</i>	Fuc $\alpha 1 \rightarrow 3(4) gal$;
	Эмульсии миндаля	не $\alpha 1 \rightarrow 2$;
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	не fuc $\alpha 1 \rightarrow 6 glcNAc$
	<i>Clostridium perfringens</i>	Широкая
	Мука бобов канавалин	

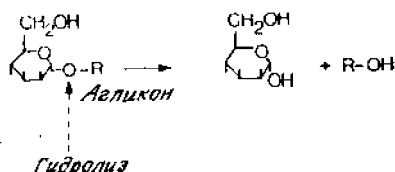


Рис. 2.4. Механизм действия экзогликозидаз.

гликозидаз, которые рассматриваются ниже (разд. 2.4) в связи с определенной сложностью их субстратной специфичности.

Все ферменты, перечисленные в таблице, относятся к экзогликозидазам: они расщепляют гликозидную связь лишь в том случае, если моносахарид является концевым остатком в цепи. Большинство экзогликозидаз обладает высокой специфичностью в отношении углеводного субстрата и аномерной конфигурации гликозидной связи. Фермент, катализирующий реакцию, приведенную на рис. 2.4, является α -маннозидазой. β -Маннозид не будет гидролизоваться под действием этого фермента. Кроме того, в зависимости от природы различных агликонов (R) многие экзогликозидазы гидролизуют соответствующие гликозиды с различной скоростью (в табл. 2.3 показаны хорошо изученные реакции). Типичный случай использования экзогликозидаз для определения последовательности моносахаридов у невосстанавливающих концов полисахаридной цепи показан на рис. 2.5. В качестве примера здесь приведено последовательное расщепление углеводной цепи основного гликопротеина орозомукоида с помощью нейраминидазы. Если этот интактный гликопротеин обработать нейраминидазой из *Streptococcus pneumoniae* (ранее называвшийся *Diplococcus pneumoniae*), то остатки сиаловых кислот отщепляются количественно. Из этого следует, что все остатки сиаловой кислоты в данном гликопротеине являются концевыми. В то же время обработка этого же белка β -галактозидазой из *S. pneumoniae* не приводит к появлению свободных остатков галактозы. Однако после удаления сиаловой кислоты β -галактозидаза отщепляет более 80%

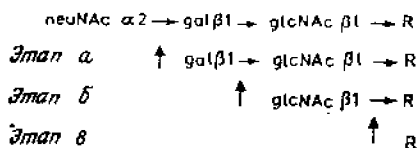


Рис. 2.5. Последовательное расщепление олигосахарида орозомукоида экзогликозидазой из *Streptococcus pneumoniae*. R — коровья область олигосахарида, связанного с белком.

остатков галактозы, содержащихся в гликопротеине. Следовательно, разрываемая связь должна быть $\beta 1 \rightarrow 4$ (табл. 2.3). Остаток N-ацетилглюкозамина, ставший конечным после обработки β -галактозидазой, может в свою очередь быть отщеплен β -N-ацетилглюкозаминидазой на этапе в. Таким образом, в данном простом случае мы определили последовательность моносахаридов с помощью набора специфических ферментов.

2.3. Строение N-гликанов

2.3.1. Овальбумин

В течение длительного времени этот главный гликопротеин белка куриного яйца служил излюбленным объектом при структурных исследованиях. Его удается выделить в чистом кристаллическом виде, т. е. в виде препарата, состоящего лишь из одного определенного полипептида с одним остатком аспарагина, который расположен в определенном положении в цепи. Именно к нему и прикрепляется углеводный компонент. Проведенное сравнительно недавно определение полной последовательности углеводной цепи овальбумина оказало значительное влияние на современные представления о биосинтетической сборке N-гликанов вообще.

Анализ строения углеводного компонента овальбумина проводился по схеме, охарактеризованной выше (табл. 2.2). Гликопептидную фракцию можно выделить методом гель-фильтрации из гидролизата, полученного после исчерпывающего протеолиза овальбумина неспецифической протеазой — проназой. Аминокислоты и не-

большие пептиды, образующиеся в результате протеолиза проназой, хорошо отделяются от аспарагин-углеводного комплекса, который имеет большую молекулярную массу. Можно было бы ожидать, что углеводсодержащий фрагмент, получаемый с помощью проназы, будет однородным веществом или же по крайней мере относительно простой смесью, так как овальбумин содержит уникальный полипептид, к которому присоединена только одна углеводная цепь. Однако на деле это оказалось не так: гликопептидную фракцию можно разделить по крайней мере на шесть компонентов (I—VI) с помощью ионообменной хроматографии [9]. Столь важное наблюдение навело на мысль, что углеводный компонент, прикрепленный к определенному остатку аминокислоты, может обладать структурной гетерогенностью. Вначале это показалось удивительным, и были затрачены значительные усилия, чтобы исключить ряд возможных обычных причин подобной гетерогенности: 1) сходная гетерогенность была обнаружена у овальбумина, выделенного из яиц одной и той же курицы; 2) все генетические варианты кур обладали одним и тем же набором гликопептидов; 3) относительный состав гликопептидов не зависел от возраста яйца; 4) поскольку белок куриного яйца обладает гликозидазной активностью, обусловленной присутствием α -маннозидаз и β -N-ацетилглюкозаминидаз, то были изучены альбумины яиц тех птиц (например, индейки), у которых гликозидная активность яичного белка либо совсем отсутствует, либо находится на незначительном уровне. Оказалось, что в этом случае обнаруживается несколько гликопептидных фракций. Следовательно, их наличие не может быть артефактом, возникающим при расщеплении гликозидазами единой исходной углеводной цепи.

Все шесть выделенных гликопептидных фракций содержат лишь одну аминокислоту — аспарагин. Очень сходен и их моносахаридный состав: всегда обнаруживаются манноза и N-ацетилглюкозамин в качестве основных (фракции I и II) или единственных (фракции III, IV, V и VI) компонентов. Фракции II—IV можно разделить на две или три подфракции [10]. Полная структура каждого из основных гликопептидов овальбумина была

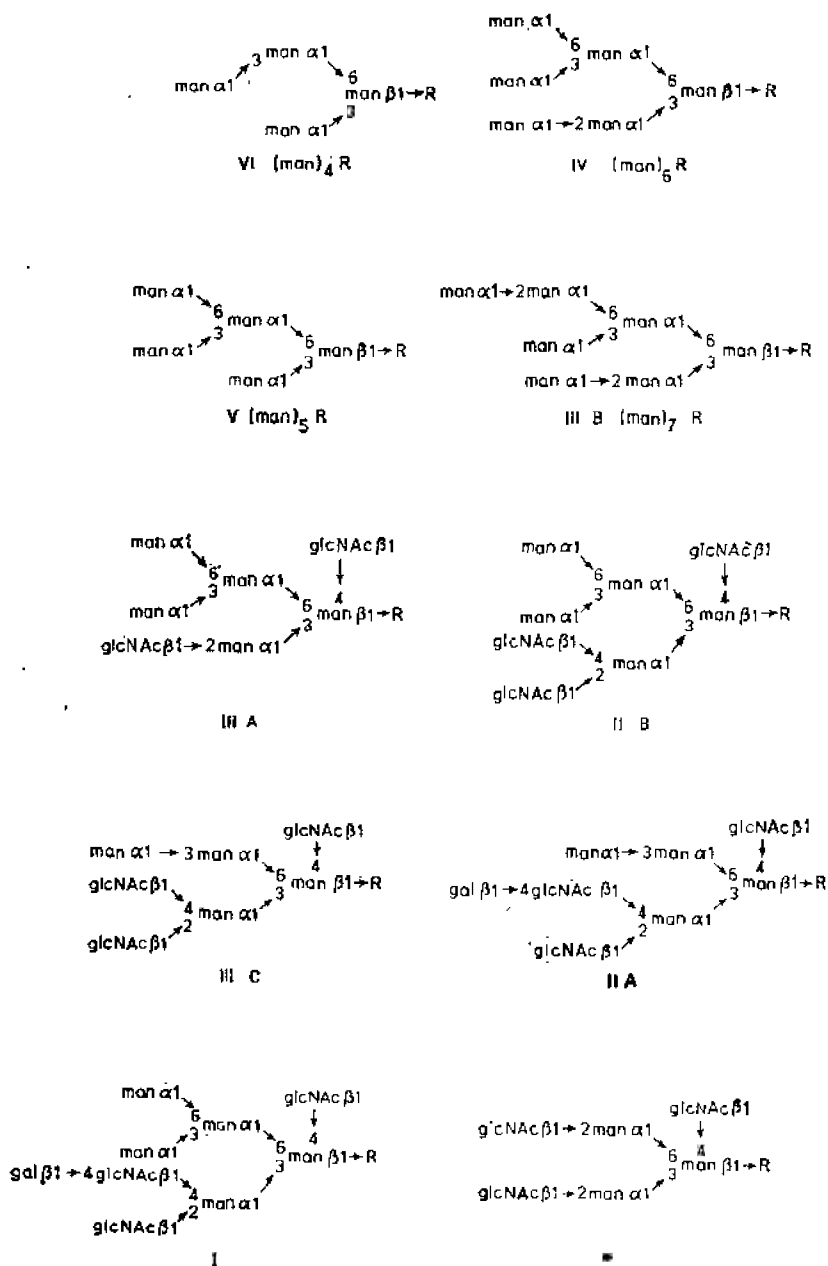


Рис. 2.6. Структура гликопептидов овальбумина. R — $\text{glcNAc}\beta 1 \rightarrow 4\text{glcNAcAsp}$. Звездочкой обозначен минорный компонент фракции V, выделенный методом электрофореза [10].

выяснена сочетанием физических, химических и ферментативных методов (рис. 2.6). Весьма удивительно, что у всех гликопептидов имеется общий участок («ядро», коровая область) связанный с аспарагином. Гликопептиды VI, V, IV и IIIB образуют группу очень сходных олигоманнозидных, или маннозообогащенных структур, содержащих от 4 до 7 остатков маннозы, а также связанную с аспарагином хитобиозу (N-ацетилглюкозаминил $\beta 1 \rightarrow 4$ N-ацетилглюкозамин). В каждом случае к гидроксильным группам при C-3 и C-5 остатка маннозы, присоединенного β -гликозидной связью к хитобиозе, в свою очередь присоединяется два маннозильных остатка α -гликозидной связью. Дальнейшее удлинение углеводной цепи происходит путем присоединения других остатков маннозы к этим α -маннозильным звеньям. Присутствие концевых α -маннозильных остатков несложно обнаружить, обрабатывая гликопептиды α -маннозидазами и определяя затем количество освободившейся маннозы. После такой обработки гликопептидов V и IV освобождается точно 4 и 5 остатков в расчете на 1 моль, как это можно было предсказать, исходя из структуры, показанной на рис. 2.6. В каждом случае гидролиз останавливается, когда достигается остаток маннозы, присоединенный β -гликозидной связью к N-ацетилглюкозамину. Во всех случаях остается один и тот же трисахарид, связанный с аспарагином и имеющий следующее строение: $\text{man}\beta 1 \rightarrow \rightarrow 4\text{glcNac}\beta 1 \rightarrow 4\text{glcNac}$. В отличие от этого после обработки экзо- β -N-ацетилглюкозаминидазой нельзя обнаружить свободных остатков N-ацетилглюкозамина. Как уже говорилось ранее, экзогликозидазы могут действовать лишь на концевые невосстанавливающие остатки, и поэтому остатки N-ацетилглюкозамина, входящие в состав хитобиозной коровой области, не чувствительны к этим ферментам. Данные, полученные в опытах с экзогликозидазами, полностью соответствуют структуре других гликопептидов овальбумина. После обработки фракций I, II и III экзо- β -N-ацетилглюкозаминидазой можно обнаружить в виде свободных сахаров несколько остатков N-ацетилглюкозамина, тогда как меньшая часть маннозильных остатков является чувствительной к α -маннозидазе. В таких гибридных цепях концевые ос-

татки β -N-ацетилглюкозамина занимают два основных положения: они присоединены или 1) ($\beta 1 \rightarrow 4$)-связью к остатку маннозы коровой области, или же 2) ($\beta 1 \rightarrow 2$)- или ($\beta 1 \rightarrow 2$)- и ($\beta 1 \rightarrow 4$)-связями к α -маннозильным остаткам, прилежающим к коровой области. В последнем случае некоторые из звеньев N-ацетилглюкозамина замещены в свою очередь галактозой и образуют N-ацетиллактозаминовую последовательность. Впервые дисахарид $\text{gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{glcNAc}$ был найден в молекуле орозомукоида (иначе называемого кислым α -гликопротеином).

2.3.2. Иммуноглобулины

Все пять классов иммуноглобулинов человека и, вероятно, все другие иммуноглобулины содержат углеводы [11]. Хотя количество и состав углеводов может быть различным в разных классах иммуноглобулинов, молекулы всех этих белков содержат N-гликаны, расположенные в константной (Fc) области тяжелых цепей. Заслуживает внимания тот факт, что между участками Fc-области, к которым прикрепляются углеводные компонен-

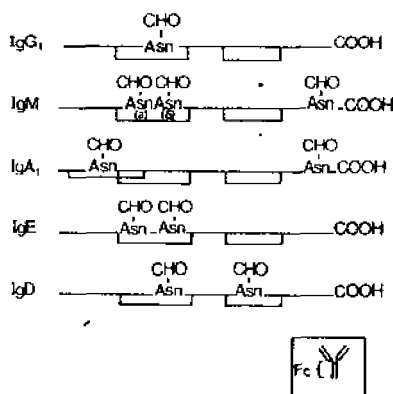


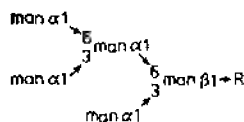
Рис. 2.7. Участки гликозилирования и внутрицепочечные дисульфидные мостики тяжелых цепей иммуноглобулинов. На врезке схематически показана интактная молекула иммуноглобулина кролика. CHO — углеводные цепи. Углеводные компоненты (а) и (б) иммуноглобулина М обсуждаются в тексте.

ты (рис. 2.7), обнаруживается значительная степень гомологии.

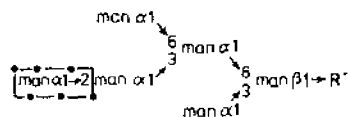
Сам факт локализации гомологичных углеводных цепей в сходных участках Fc-области у всех иммуноглобулинов дает все основания думать, что необходимая последовательность аминокислот вокруг остатков аспарагина варьирует очень мало и, по-видимому, имеет весьма важное структурное и функциональное значение скорее всего как точка прикрепления функционально важных гликанов.

Сейчас уже имеются детальные данные о строении двух углеводных цепей иммуноглобулина М человека и одной цепи — иммуноглобулина G человека. В качестве объекта исследования были использованы иммуноглобулины, выделенные из сыворотки двух больных с миеломой. Эти белки следует рассматривать как продукты секретиции клеточных клонов, кодируемые в каждом случае определенными генами. Тем не менее и в этих случаях была найдена значительная гетерогенность в строении углеводов, сходная с указанной выше гетерогенностью гликанов овальбумина.

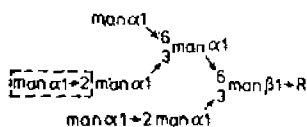
В молекуле иммуноглобулина М миеломы человека при каждом остатке аспарагина имеются углеводные цепи двух основных типов: цепи, содержащие только маннозу и N-ацетилглюкозамин, и цепи, содержащие, кроме того, сиаловую кислоту, галактозу и фукозу. Структура цепей второго типа еще не выяснена. Строение олигоманнозидных цепей показано на рис. 2.8. Необходимо сделать два замечания. Во-первых, все последовательности строятся путем добавления остатков α -маннозы к трисахариду коровой области $\text{man}\beta 1 \rightarrow 4\text{glcNAc}\beta 1 \rightarrow 4\text{glcNAc}$, причем вначале происходит присоединение одного остатка маннозы к C-3, а затем трех остатков маннозы по C-6 центрального β -маннозильного остатка. Такая последовательность $(\text{man})_3R$ идентична по своему строению гликопептиду овальбумина (рис. 2.6). Структуры, идентичные гликопептидам III и IV овальбумина, были обнаружены среди углеводных цепей иммуноглобулинов (минорный компонент (б) и главный компонент (б) соответственно). Кроме того, у иммуноглобулина М обнаружены и крупные структуры с более высоким со-



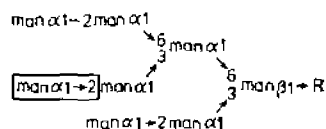
Главный компонент (a)



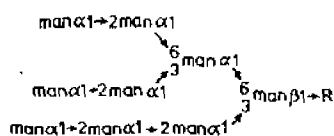
Главный компонент (a)



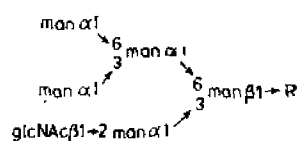
Минорный компонент (a)



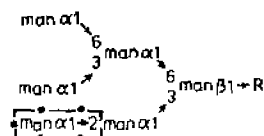
Минорный компонент (a)



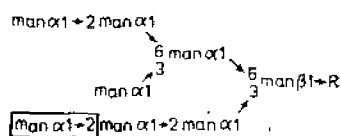
Минорный компонент (a)



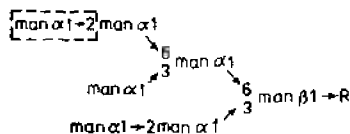
Минорный компонент (a)



Главный компонент (б)



Главный компонент (б)



Минорный компонент (б)

держанием α -маннозильных звеньев, чем у гликопептидов овалбумина. Это — два изомера $(\text{ман})_8\text{R}$ и одна последовательность $(\text{ман})_9\text{R}$. Во-вторых, очень важно подчеркнуть наличие асимметрии гликозилирования в участках (а) и (б) тяжелой цепи иммуноглобулина М. Лучше всего это объясняется тем, что в участках (а) и (б) имеются углеводные компоненты, содержащие по 6 остатков маннозы. Пять из этих остатков расположены в обоих случаях идентично, а еще один ($\alpha 1 \rightarrow 2$) присоединен к разным остаткам углеводных цепей участков (а) и (б). Сходная асимметрия отмечается в цепях, содержащих 7 и 8 остатков маннозы; они также различаются по расположению одного α -маннозильного остатка. Сейчас еще не совсем ясны причины этих тонких различий в строении гликанов, имеющих сходную общую структуру и прикрепляющихся к остаткам аспарагина, расположенных рядом в одной полипептидной цепи. Однако, как будет подробно обсуждаться в следующей главе, описанное строение олигоманнозидных цепей этого иммуноглобулина человека объяснимо с точки зрения механизма биосинтеза N-гликанов.

Наконец, следует отметить минорный компонент участка (а), содержащий концевой остаток N-ацетилглюкозамина. Как будет сказано ниже, этот углевод является важным промежуточным продуктом при сборке «сложных» гликанов, содержащих галактозу, фукозу и сиаловую кислоту. Подобные гликаны обнаружены в иммуноглобулинах и других гликопротеинах.

На рис. 2.9 [10] показано строение углеводных компонентов гликопептидов, выделенных из проназного гидролизата иммуноглобулина G. Этот белок был получен из сыворотки больного множественной миеломой. Разделение гликопептидов проводили с помощью хроматографии на смоле дауэкс-50. Первым выходил кислый гликопептид (А), а затем элюировалась смесь нейтральных

Рис. 2.8. Строение N-гликанов иммуноглобулина М человека. R — $\text{glcNAc}\beta 1 \rightarrow 4\text{glcNAc Asp}$; (а) и (б) — два участка гликозилирования Fc-области, показанной на рис. 2.7. Вариабельные остатки α -маннозы обведены прямоугольниками [13].

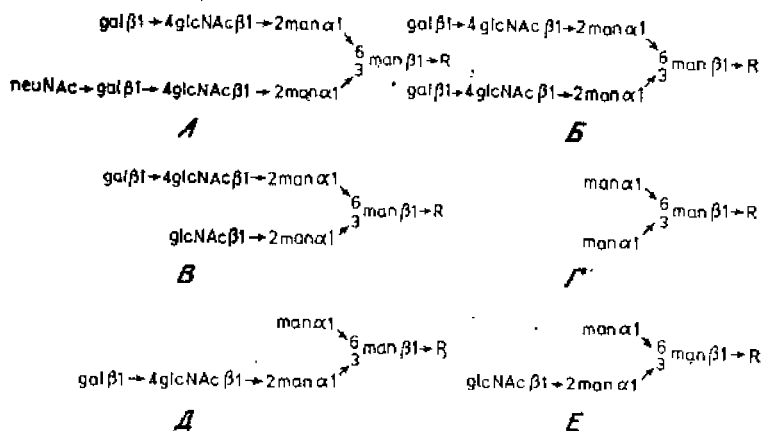


Рис. 2.9. Структура гликопептидов миеломного иммуноглобулина G человека и продукты их расщепления под действием экзогликозидазы. R — $glcNAc\beta 1 \rightarrow 4(fuca1 \rightarrow 6)\text{glcNAc}\text{Asn}$.

гликопептидов (B и B), которую в свою очередь можно было разделить для последующего структурного анализа. Последовательная обработка всех этих гликопептидов нейраминидазой (только для A), β -галактозидазой и β -N-ацетилглюкозаминидазой приводила к образованию одного и того же олигосахарида (Г), содержащего два остатка α -маннозы, связанных с коровой областью. Очевидно, что содержащийся в овальбумине олигосахарид с высоким содержанием маннозы в иммуноглобулине G в значительных количествах не содержится. Однако к двум остаткам α -маннозы присоединены остатки N-ацетилглюкозамина и галактозы, причем в некоторых случаях теми же связями, что и у гликопептидов овальбумина (например, в фракции I). Асимметрия гликопептида A иммуноглобулина является его интересной особенностью. К боковой цепи, присоединенной ($\alpha 1 \rightarrow 3$)-связью к центральному остатку β -маннозы коровой области, присоединен единственный остаток N-ацетилнейраминной кислоты. Наличие подобной структуры поднимает вопрос о специфичности гликозилтрансфераз, прикрепляющих остатки сиаловой кислоты к концевой галактозе

подобных углеводных цепей (этот вопрос рассматривается в следующей главе). Такая асимметрическая структура имеет особое значение, поскольку служит субстратом для специфических гликозилтрансфераз. Обработка кислого гликопептида *A* β -галактозидазой с последующей обработкой β -N-ацетилглюкозаминидазой, а затем и нейраминидазой дает углеводную цепь *D*. Обработка последней β -галактозидазой приводит к появлению цепи *E*. Обычно структуры *D* и *E* не встречаются в нативных иммуноглобулинах *M*, однако, как указывалось выше, углевод, аналогичный *E*, был обнаружен в иммуноглобулине *M*. Еще одной особенностью этих N-гликанов является наличие остатка фукозы, присоединенного к хитобиозе коровой области связью $\alpha 1 \rightarrow 6$ (к первому остатку в цепи). Важно отметить, что описанные гликопептиды входят в состав иммуноглобулинов *G*, секретируемых той конкретной миеломой, которая была использована в этих опытах [10, 11]. Каждая из миелом отличается от других, причем все они образуют довольно различные наборы гликанов иммуноглобулинов.

2.3.3. Орозомукоид

Некоторые структурные особенности этого важного сывороточного белка уже обсуждались выше. Его единственная полипептидная цепь содержит пять гликозилированных остатков аспарагина, локализованных, как показано на рис. 2.10. К настоящему времени описаны полные последовательности десиалированных N-гликанов орозомукоида. Установлено также их место прикрепления к полипептидной цепи. Прежде чем осуществить

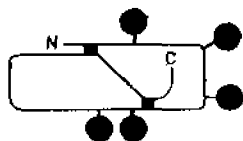


Рис. 2.10. Участки гликозилирования (черные кружки) полипептидной цепи орозомукоида. Черные квадратики — две внутрицепочечные дисульфидные связи.

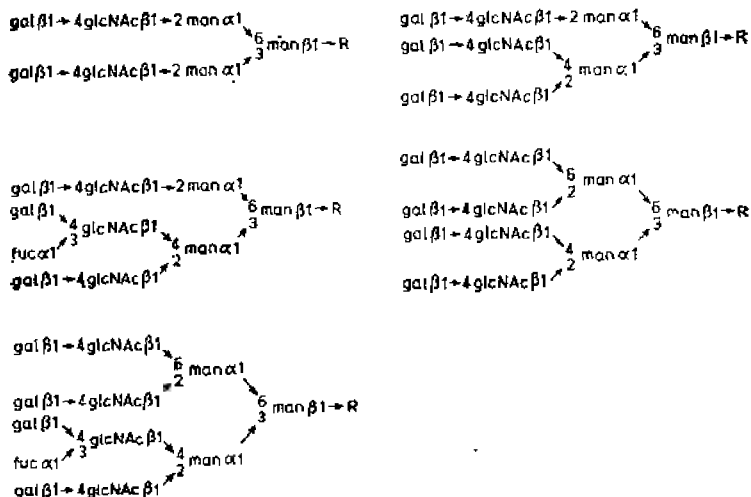


Рис. 2.11. Строение N-гликан орозомукоида. R — $\text{glcNAc } \beta \rightarrow 4 \text{ glcNAc Asp}$.

разделение орозомукоида на отдельные гликопептиды под действием химотрипсина, производят удаление сиаловой кислоты. Поскольку химотрипсин обладает довольно узкой специфичностью, то в результате описанной процедуры образуется смесь гликопептидов, каждый из которых имеет одну из пяти уникальных аминокислотных последовательностей, локализацию которых в пептидной цепи легко установить. Для улучшения последующего разделения шестнадцати гликопептидов с помощью ионообменной хроматографии проводится удаление сиаловых кислот, что позволяет использовать различия в общем заряде пептидов и в размерах их углеводных цепей. Для выяснения строения гликопептидов использовался метод ЯМР высокого разрешения. В каждом случае для определения было необходимо всего 2—3 мг гликопептидов, что лишний раз указывает на большую ценность этого аналитического метода [14].

В результате описанных опытов у различных гликопептидов были обнаружены некоторые ранее неизвест-

ные свойства. Кроме того, в этих же опытах были подтверждены данные, полученные ранее при расщеплении интактных гликопротеинов (разд. 2.2.1). Остатки сиаловой кислоты преимущественно присоединены к N-ацетиллактозаминным звеньям, расположенным на концах разветвленных олигосахаридов. В орозомукоиде отсутствуют олигоманнозидные цепи, и углеводные компоненты относятся к «сложному» типу, содержащему много звеньев peuNAc.gal.glcNAc , которые присоединены к общей центральной области, состоящей из двух остатков α -маннозы, одного остатка β -маннозы и одного остатка хитобиозы. Как и у сложных цепей иммуноглобулина G, здесь тоже имеется четкая асимметрия в структурах, содержащих три или более концевых остатков N-ацетиллактозамина. Один из остатков α -маннозы, связанных с C-3 остатка β -маннозы, замещен при C-2 и C-4, тогда как другой — при C-2 и C-6. Причиной такой асимметрии, вероятнее всего, является субстратная специфичность разных N-ацетилглюкозаминилтрансфераз, ответственных за присоединение в ходе сборки цепи каждого из остатков N-ацетилглюкозамина к цепи-предшественнику. Имеющиеся данные о субстратной специфичности двух таких ферментов обсуждаются в гл. 3.

Другой характерной особенностью N-гликанов орозомукоида оказалось присутствие фукозы, присоединенной ($\alpha 1 \rightarrow 3$)-связью к определенному остатку N-ацетилглюкозамина. Тот факт, что замещенными являются строго определенные остатки N-ацетилглюкозамина в разветвленных цепях, еще раз указывает на наличие очень узкой специфичности у $\alpha 1 \rightarrow 3$ — фукозилтрансфераз. В отличие от иммуноглобулина G в орозомукоиде фукоза не присоединяется к хитобиозе.

Из приведенного краткого обзора наших знаний о строении N-гликанов можно сделать следующие выводы: 1) сборка N-гликанов осуществляется в результате согласованного действия многих гликозилтрансфераз, каждая из которых имеет очень узкую субстратную специфичность; 2) активность этих ферментов заметно изменяется в зависимости от того, какой участок полипептидной цепи подвергается гликозилированию. В ходе изучения биосинтеза N-гликанов были получены под-

тверждения приведенным выше выводам. Эта проблема будет обсуждаться в следующей главе.

2.4. Эндогликозидазы

Как уже кратко обсуждалось в разд. 2.2.1, эндогликозидазы гидролизуют внутренние связи углеводной цепи, что приводит к высвобождению олигосахаридов из гликопротеинов или гликопептидов, полученных в результате протеолиза из гликопротеинов. Сейчас уже известно много эндогликозидаз (табл. 2.4) [8]. Чтобы охарактери-

Таблица 2.4. Эндогликозидазы [8]

Фермент	Источник
Тип А	
Эндо- β -N-ацетилглюкозаминидаза	
D	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
H	<i>Streptomyces plicatus</i>
CI и CII	<i>Streptomyces griseus</i>
	<i>Clostridium perfringens</i>
	Иижир, почки, печень, селезенка
	млекопитающих, яйцевод кур
Тип В	
Эндо- β -N-ацетилгалактозаминидаза	Эмульсия миндаля
Эндо- β -галактозидаза	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
	<i>Clostridium perfringens</i>
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
	<i>Escherichia freundii</i>

зовать их специфичность, необходимо иметь олигосахариды или гликопептиды с известным строением, такие, например, как фрагменты овальбумина. В свою очередь специфические эндогликозидазы служат исключительно ценным инструментом для определения структурных особенностей углеводных цепей гликопротеинов. Эти ферменты способны реагировать с интактными гликопротеинами и даже с теми из них, которые расположены на

Фермент (ы)	Структура, чувствительная к ферменту
Тип А D CI	
Н	
СII	
Тип В Эмульсин миндаль	

Рис. 2.12. Специфичность действия эндо- β -N-ацетилглюкозаминидаз. R — атом водорода или остаток сахара.

поверхности неповрежденных клеток. Поэтому с их помощью, возможно, удастся непосредственно выяснить, какова биологическая роль углеводных компонентов гликоконъюгатов.

Все эндо- β -N-ацетилглюкозаминидазы типа А расщепляют гликозидную связь между двумя остатками N-ацетилглюкозамина, непосредственно присоединенных к аспарагиновому остатку полипептида (рис. 2.12). Ферменты D и CI (но не H или CII) гидролизуют эту связь, даже если хитобиоза замещена фукозой, как это имеет место в гликопептидах иммуноглобулина G (рис. 2.9). Эти ферменты обладают также и другими различиями

по специфичности. Остаток 3 α -замещенной маннозы, расположенной на нередуцирующем конце гликопептида, чувствительного к ферментам D и CI, должен быть незамещенным, например как у гликопептидов VI или V овальбумина. Гликопептид IV не является субстратом для этих ферментов. Данные ферменты гидролизуют также олигосахариды, например продукты, получаемые при гидролизе эндо- β -N-ацетилглюкозаминидазой типа B. Для гликозидазы H требуется более сложная цепь из остатков α -маннозы, присоединенных к C-6 β -маннозильного остатка трисахаридной коровой области гликопептидов. Этот фермент неактивен, если к коровой области присоединена фукоза. Под действием гликозидаз H и CII быстро расщепляются гликопептиды IIIA, IIIB, IV, V и VI овальбумина. Однако имеется два принципиальных различия между двумя этими ферментами. Во-первых, гликозидаза CII требует наличия разветвленной структуры, в которой как C-3, так и C-6 остатка β -маннозы замещены остатками α -маннозы. Во-вторых, фермент CII не действует на цепи, содержащие 4-O-замещенный остаток маннозы, который присоединен α 3-связью к коровой области, поскольку для проявления его активности гидроксильная группа в положении 4 должна быть незамещенной (рис. 2.12) [11].

Эндо- β -N-ацетилглюкозаминидаза типа B (например, из эмульсина миндаля [15]) способна действовать как на интактные гликопротеины, так и на гликопептиды. Расщепляемая при этом связь расположена между N-ацетилглюкозаминном и аспарагином (рис. 2.12).

Эндо- β -N-ацетилгалактозаминидаза стрептококка обладает высокой специфичностью в отношении дисахарида gal β 1 $\rightarrow$ 3galNAc, прикрепленного к серину или треонину полипептидной цепи, что характерно для многих O-гликанов гликопротеинов. Однако если этот дисахарид является замещенным, то фермент перестает действовать. Разумеется, это ограничивает его использование. Сходный фермент выделен из культуральной жидкости *Clostridium perfringens*. В результате катализируемой им реакции образуются свободный дисахарид gal β 1 $\rightarrow$ 3galNAc и полипептидная цепь.

Эндо- β -галактозидазы специфичны и в отношении

Фермент	Последовательность
<i>Flavobacter keratolyticus</i>	$R_1 \rightarrow \text{glcNAc} \beta 1 \rightarrow 3 \text{gal} \beta 1 \rightarrow 4 \text{glc} (\text{glcNAc}) \rightarrow R_2$
<i>Escherichia freundii</i>	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	$\text{gal} (\text{galNAc}) \alpha 1 \rightarrow 3 \text{gal} \beta 1 \rightarrow 4 \text{glcNAc} \beta 1 \rightarrow R_1$ $\quad \quad \quad \uparrow \quad \quad \quad \uparrow$ $\quad \text{fuc} \alpha 1 \quad \quad (\text{fuc} \alpha 1)$ $\quad \quad \quad \quad \quad \text{Ome}$

Рис. 2.13. Субстратная специфичность эндо-β-галактозидаз. R₁ — атом водорода или остаток сахара. R₂ — атом водорода, остаток сахара или церамид.

протяженных углеводных последовательностей. Фермент из *E. freundii* гидролизует внутреннюю галактозидную связь в углеводных цепях гликопротеинов, если галактоза соединена (β1→4)-связью с N-ацетилглюкозаминном, или же в гликолипидах, если галактоза соединена такой же связью с глюкозой, которая в свою очередь присоединена к церамидному звену. Расщепление таких внутренних связей происходит даже в случае очень длинных олигосахаридных цепей, образующихся при добавлении остатков сахаров к нередуцирующему концевому остатку N-ацетилглюкозамина (рис. 2.13). При замещении C-6 галактозного остатка, входящего в состав важного трисахаридного звена, чувствительность к ферменту полностью исчезает. Однако присоединение сульфата к N-ацетилглюкозамину на активность фермента не влияет. Такая сульфатированная структура, в частности, встречается в кератансульфате — компоненте протеогликанов. Последние гидролизуются ферментом, причем происходит накопление свободных цепей $\text{neuNAc} \rightarrow \text{galNAc}(\text{SO}_4) \rightarrow \text{gal}$. Сходной специфичностью обладает фермент из *Flavobacter*. Оба эти фермента были получены в гомогенном виде. Их молекулярная масса оказалась равной 35 000. Различие между обсуждаемыми ферментами заключается в том, что фермент из *Flavobacter* является конститутивным, тогда как синтез и секреция фермента из *Escherichia freundii* индуцируются

лишь при выращивании бактерии на среде с кератан-сульфатом или гликопротеинами, имеющими соответствующие связи в гликанах.

Эндо- β -галактозидаза стрептококка гидролизует разветвленные олигосахариды, показанные на рис. 2.13. Эти углеводы представляют собой антигенные детерминанты веществ группы крови А (с концевым остатком N-ацетилгалактозамина) или В (с концевой галактозой). Необходимой частью субстрата является N-ацетилглюкозамин, и соответственно фермент гидролизует связи $\text{gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{glcNAc}$, но не $\text{gal}\beta 1 \rightarrow 3\text{glcNAc}$. Обе эти связи присутствуют в разных цепях, замещенных, во-первых, фукозой, а во-вторых, либо галактозой, либо N-ацетилгалактозамином. В результате получаются цепи с активностью антигенов групп крови А и В. Интересно, что фермент из стрептококка может не только различать эти антигенные структуры, но специфичность его даже выше, чем у соответствующих антител.

2.5. Строение О-гликанов

В дополнение к сказанному выше о О-гликанах коллагена следует еще обсудить ряд характерных свойств гликанов, присоединенных гликозидной связью к гидроксильным группам аминокислот.

2.5.1. Секреты гликопротеиновой природы (муцины)

С гликопротеинами, содержащими большие количества гликанов, прикрепленных О-гликозидной связью, знаком каждый, кто видел грязноватый след, оставляемый улиткой, движущейся по сухой дороге, или кому удалось отведать в китайском ресторане суп из ласточкиных гнезд. Эти и сходные с ними гликопротеины часто называют муцинами или мукоидами из-за их исключительно высокой вязкости и желеобразного вида. Немецкий химик Хоппе-Зейлер (Hoppe-Seyler) применил для их обозначения малоблагозвучное слово Schleimstoff, т. е. слизь. Эти вещества весьма неприятны на вид и неудобны для работы с ними, в частности при попытках осуществить их химический и физический анализы. Все

же следует помнить, что «муцины» выполняют жизненно важные функции. Очень существенным для высших организмов (позвоночных и беспозвоночных) является тот факт, что полости дыхательного, пищеварительного и мочеполового трактов покрыты слоем клеток, секретирующих вязкие гликопротеины. В качестве примеров таких секретов следует привести слюну (между прочим, именно она является основной составной частью супа из ласточкиных гнезд), секреты бронхов и кишечника, семенную жидкость и выделения шейки матки. Все они могут играть роль смазки, например в пищеварительном тракте. Кроме того, толстый вязкий слой служит защитой подлежащей ткани от повреждений, как механических, так и химических (например, пищеварительных соков).

Гликопротеины секретов в течение многих лет подвергались интенсивному изучению. Это объясняется как их важной биологической ролью, так и связью с некоторыми тяжелыми заболеваниями, например такими, как кистозный фиброз. Состав углеводов лучше всего изучен у секрета слюнных желез, в частности у гликопротеинов секрета подчелюстной железы. Двадцать лет тому назад Альфред Готтшалк (Gottschalk) сначала в Австралии, а затем в Западной Германии очень подробно изучил строение самого простого вещества, найденного в железах барана. В этом гликопротеине дисахарид, состоящий из остатков N-ацетилнейраминовой кислоты и N-ацетилгалактозамина, присоединен ко многим остаткам серина и треонина полипептидной цепи (рис. 2.14). Оказалось, что один из шести аминокислотных остатков является гликозильрованным серином или треонином, а всего их насчитывается около 200 на одну полипептидную цепь. Третьей, наиболее часто встречающейся аминокислотой в гликопротеинах секрета подчелюстной железы является пролин, и поэтому гликозильрованные участки им очень богаты. Сам белок напоминает по своему строению гребенку: короткие углеводные цепи, как зубья, торчат из жесткой, богатой пролином полипептидной основы. Эти подобные гребенке структуры с помощью дисульфидных мостиков между белковыми глобулами и создают большие молекулы гликопротеина с особыми вязкими свой-

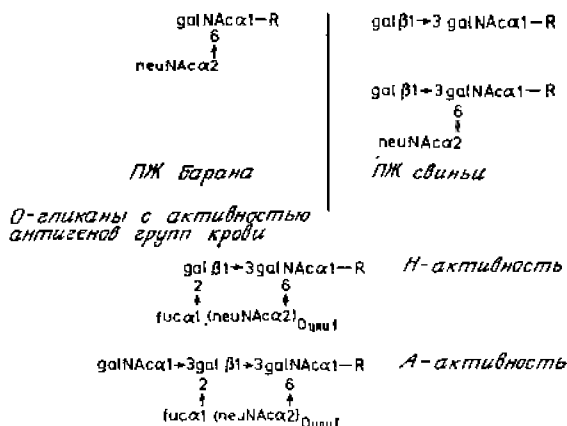


Рис. 2.14. Строение О-гликанов белков секрета подчелюстной железы (ПЖ). Остаток N-ацетилгалактозамина связан с серином (или треонином). R — остаток серина или треонина полипептидной цепи.

ствами [4]. В молекулах гликопротеинов секретов подчелюстной железы других видов животных к полипептидам прикреплены не только описанные выше дисахариды (рис. 2.14), но еще много других олигосахаридных цепей. Так, в хорошо изученном секрете подчелюстной железы свиньи найден нейтральный дисахарид $\text{gal}\beta 1 \rightarrow 3 \text{ galNAc}$; кроме того, обнаружены и его сialiрированные формы. Особый интерес представляют цепи гликопротеина свиньи, содержащие фукозу. Обнаружить такие цепи очень легко, поскольку они встречаются также и в секретах человека, например в антигене группы крови Н. Присоединение остатка N-ацетилгалактозамина превращает антигенную детерминанту Н в антиген группы крови А, причем подобная структура имеется также в гликопротеинах подчелюстной железы свиньи (рис. 2.14).

О слизистых секретах желудка и кишечника известно очень мало, хотя их и нетрудно получить. Причина этого заключается в том, что такие секреты представляют собой смесь многих гликопротеинов, разделить которые весьма трудно. На рис. 2.15 показано строение некоторых из О-гликанов, обнаруженных в последнее время

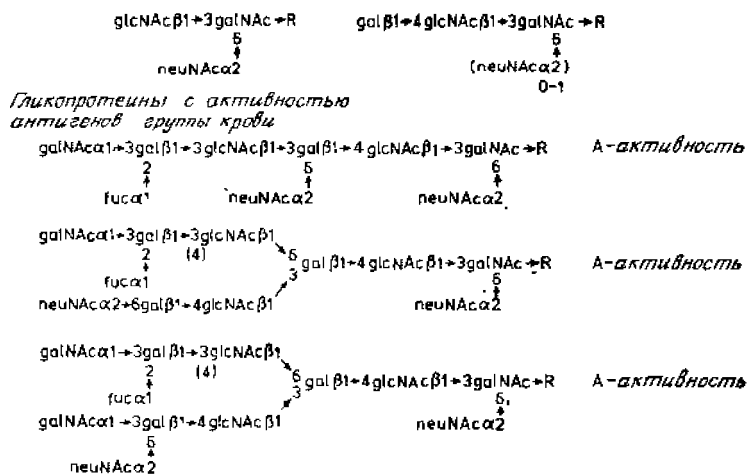


Рис. 2.15. Строение О-гликанов гликопротеинов толстой кишки крысы. R — остаток серина или треонина полипептидной цепи [16].

[16] в толстой кишке крыс. Следует отметить ряд их характерных особенностей, и прежде всего новый тип связи: N-ацетилглюкозаминил ($\beta 1 \rightarrow 3$) N-ацетилгалактозамин. Первый из этих остатков служит точкой удлинения цепи с превращением ее в очень сложную последовательность. Самая длинная цепь при этом оканчивается участком, характерным для А-детерминанты (сравните с присутствующей в секретах подчелюстной железы свиньи цепью, ответственной за А-активность; рис. 2.14).

2.5.2. Антигены групп крови

Строго говоря, обозначение «группы крови» относится к антигенным различиям между эритроцитами разных индивидуумов, выявляемым с помощью специфических антител [2]. В начале этого столетия Карл Ландштейнер (Landsteiner) описал основные группы крови системы АВО(Н). Это открытие вызвало большой интерес еще и потому, что появился источник естественно встречающихся антител, причина образования которых, впрочем,

остается неизвестной и по сей день. Например, индивидуумы, имеющие на поверхности своих эритроцитов антиген группы крови А, в то же время содержат большое количество антител против детерминант В, и наоборот. Люди с группой крови О имеют антитела как против А-, так и против В-детерминант. Естественно, что открытие групп крови имело громадное значение для развития практики переливания крови. Совершенно очевидно, к каким катастрофическим последствиям приводят ошибки при определении группы крови. Интенсивные исследования структурных основ антигенности АВО(Н) были проведены Уолтером Морганом, Винифредом Уоткинсом, Элвиным Кэбатом (Morgan, Watkins, Kabat) и многими другими. Благодаря им мы теперь знаем, что свойства антигенов групп крови зависят от строения углеводов. Последнее в свою очередь полностью определяется генетическим контролем за их сборкой. Более того, сейчас стало очевидно, что гликопротеины разных тканей также обладают антигенными детерминантами, сходными с таковыми для антигенов эритроцитов. Поэтому биологические функции углеводных цепей, каковы бы они ни были, а также их строго генетический контроль у человека нельзя объяснить наличием этих цепей только лишь на поверхности эритроцитов.

Углевод, секретируемый индивидуумами О-генотипа, называется Н-антигеном. В качестве обязательного компонента он имеет остаток фукозы, присоединенный к С-2 остатка галактозы. Последний связан с С-3 или С-4 соседнего N-ацетилглюкозамина. Иногда остатка фукозы может и не быть, что обуславливает в свою очередь отсутствие антигенов А, В или Н на поверхности эритроцитов или у секретируемых гликопротеинов (рис. 2.16). Индивидуумы с этим редким отклонением были впервые обнаружены в Индии, и соответствующий фенотип поэтому был назван бомбейским (Bombay).

В результате присоединения остатков N-ацетилгалактозамина или галактозы ($\alpha 1 \rightarrow 3$)-гликозидной связью Н-детерминанта может быть превращена либо в А-, либо в В-детерминанты соответственно.

Совершенно очевидно, что детерминанты А, В и Н находятся на концах О-гликанов секретируемых гли-

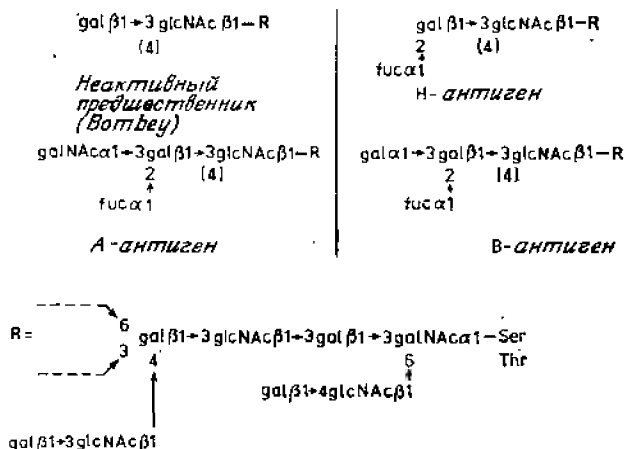


Рис. 2.16. Секретируемые гликопротеины человека с антигенными детерминантами системы АВО (H).

копротеинов. Но что же представляет собой последовательность коровой области этих О-гликанов? Как мы уже видели, существует большое их разнообразие. Например, в гликопротеинах секрета подчелюстной железы свиньи антигенные детерминанты присоединены непосредственно к остатку N-ацетилгалактозамина, который связан с полипептидом (рис. 2.14). Значительно более длинная последовательность, к которой присоединяются антигенные детерминанты, имеется в гликопротеинах толстых кишок крысы (рис. 2.15). Последовательность коровой области гликопротеинов секретов человека с А-, В- и Н-активностью еще полностью не установлена. Предполагаемая структура веществ, секретируемых кистой яичника, показана на рис. 2.16.

Следует подчеркнуть, что рассматриваемые здесь углеводы относятся к секретируемым гликопротеинам. Естественно тогда спросить: что же представляют собой активные вещества группы крови, находящиеся в мембранах эритроцитов и впервые обнаруженные Ландштейнером (Landsteiner)? Хотя эта проблема еще до конца и не решена, есть основания полагать, что большинство

Группа крови		Последовательность
A	Неактивна (<i>Bombey</i>)	$\text{gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{ glcNAc}\beta 1 \rightarrow 3 \text{ gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{ glc}-$
B	H	$\text{gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{ glcNAc}\beta 1 \rightarrow 3 \text{ gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{ glc}-$ $\begin{array}{c} 2 \\ \uparrow \\ \text{fuc}\alpha 1 \end{array}$
B	A	$\text{galNAc}\alpha 1 \rightarrow 3 \text{ gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{ glcNAc}\beta 1 \rightarrow 3 \text{ gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{ glc}-$ $\begin{array}{c} 2 \\ \uparrow \\ \text{fuc}\alpha 1 \end{array}$
Г	B	$\text{gal}\alpha 1 \rightarrow 3 \text{ gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{ glcNAc}\beta 1 \rightarrow 3 \text{ gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{ glc}-$ $\begin{array}{c} 2 \\ \uparrow \\ \text{fuc}\alpha 1 \end{array}$
Д	A	$\text{galNAc}\alpha 1 \rightarrow 3 \text{ gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{ glcNAc}\beta 1 \rightarrow 3 \text{ gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{ glcNAc}\beta 1 \rightarrow 3 \text{ gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{ glc}-$ $\begin{array}{c} 2 \\ \uparrow \\ \text{fuc}\alpha 1 \end{array}$
Е	A	$\text{galNAc}\alpha 1 \rightarrow 3 \text{ gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{ glcNAc}\beta 1 \rightarrow 6 \text{ gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{ glcNAc}\beta 1 \rightarrow 3 \text{ gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{ glc}-$ $\begin{array}{c} 2 \\ \uparrow \\ \text{fuc}\alpha 1 \end{array}$ $\text{galNAc}\alpha 1 \rightarrow 3 \text{ gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{ glcNAc}\beta 1 \rightarrow 3 \text{ gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{ glc}-$ $\begin{array}{c} 2 \\ \uparrow \\ \text{fuc}\alpha 1 \end{array}$

Рис. 2.17. Гликолипиды мембраны эритроцитов человека, имеющие антигенную активность групп крови. Жирными стрелкам обозначены связи, чувствительные к эндо- β -галактозидазе.

углеводных цепей с антигенными свойствами вообще отсутствует в гликопротеинах и имеется лишь в гликолипидах [17]. Основная структура гликолипидов изображена на рис. 2.17; в этих соединениях найдены лишь цепи типа $\text{gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{ glcNAc}$. Наиболее простыми по строению гликолипидами с активностью групп крови являются вещества типа А—Г, однако найдены и более сложные структуры, например Д и Е.

Для всех этих цепей отличительной чертой является наличие повторяющихся последовательностей N-ацетилглюкозаминил ($\beta 1 \rightarrow 3$)галактоза, соединенных ($\beta 1 \rightarrow 4$)-связями. Антигенные детерминанты А, В и Н получаются в результате присоединения таких моносахаридов, как фукоза и N-ацетилгалактозамин или галактоза, к концевому остатку галактозы, присоединенной к повторя-

ющейся последовательности ($\beta 1 \rightarrow 4$)-связью. Если эти остатки отсутствуют, то выявляются антигены другой системы групп крови человека, обозначаемые как I_i -антигены. Как и в первоначальных работах Ландштейнера по группам крови человека АВО(Н), для определения I_i -антигенов используются антитела, встречающиеся в крови некоторых индивидуумов. Весьма вероятно, что специфические антитела к I - и i -детерминантам способны распознавать соответственно разветвленные (E) и неразветвленные (D) варианты углеводных цепей (рис. 2.17).

Накапливается все больше данных о том, что значительное количество антигенных детерминант групп крови имеется также и в гликопротеинах мембран эритроцитов и других клеток. Эти детерминанты располагаются на длинных цепях подобно тем, которые имеются в сложных гликолипидах D и E . Они чувствительны к эндо- β -галактозидазе из *E. freundii*. Обработка этим ферментом эритроцитов приводит к полной потере антигенных детерминант I_i , а гликопротеин, обозначаемый как белок «полосы 3» (разд. 2.6.2), превращается при этом в низкомолекулярный компонент с небольшим содержанием углеводов. Согласно другим данным, у этого же гликопротеина имеется лишь одна такая углеводная цепь [17]. Обсуждаемые длинные углеводные последовательности,

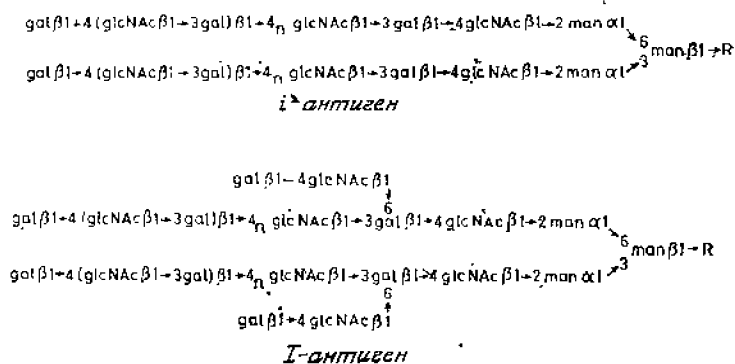


Рис. 2.18. Строение «полигликозил»-N-гликанов гликопротеинов. R — $\text{glcNAc}\beta 1 \rightarrow 4 \text{glcNAc. Asn}$.

называемые *полигликозильными* единицами и входящие в состав гликопротеинов «полосы 3» эритроцитов, являются также минорными компонентами мембранных гликопротеинов у некоторых других типов клеток, например фибробластов. Полигликозильные цепи гликопротеинов прикрепляются к коровой области N-гликанов, как показано на рис. 2.18. У полигликозильных цепей, обладающих I-активностью, от основной повторяющейся последовательности отходят ответвления из нескольких остатков галактозы. Такие разветвленные полигликозильные цепи преобладают у зрелых эритроцитов, тогда как эритроциты плода содержат неразветвленные формы цепей, характерные для i-антигена. Очевидно, что ферменты, ответственные за возникновение разветвлений, появляются в ходе развития организма, однако пока непонятно, какое это может иметь значение для нормального созревания клеток эритроидного ряда.

2.6. Мембранные гликопротеины.

Общие представления

Выше мы обсуждали строение гликопротеинов, выделяемых из жидкостей организма, например из крови, или же из клеточных секретов. Но гликопротеины являются также важными составными частями всех клеточных мембран, изученных до настоящего времени [18]. Плазматические мембраны особенно богаты гликопротеинами, и основное внимание исследователей сейчас обращено на выяснение строения именно этих белков, их организации в самой мембране, а также на функции мембранных гликопротеинов, в частности их углеводных компонентов. Особенно удобными объектами исследования оказались эритроциты человека, поскольку они имеют лишь одну мембрану. При их изучении было получено очень много данных, которые можно, по-видимому, распространить и на мембранные системы более сложно устроенных клеток.

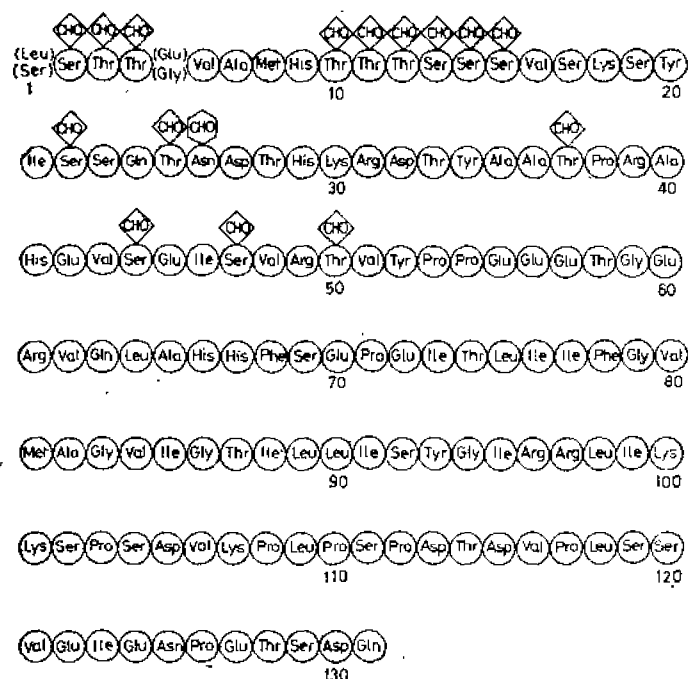
2.6.1. Гликофорин

Мембраны эритроцитов человека содержат относительно небольшое число главных белков. Из них три особенно богаты углеводами, и их можно выделить избирательным экстрагированием, например смесью хлороформ — метанол, фенолом или динодсалицилатом лия с последующим разделением по молекулярной массе [19]. Эти гликопротеины обозначают как гликофорины А, В и С. Гликофорин А — главный гликопротеиновый компонент мембраны эритроцитов. Его полная структура показана на рис. 2.19.

Гликофорин А с молекулярной массой 29 000 состоит из одной полипептидной цепи, построенной из 131 аминокислотного остатка. При изучении его первичной структуры были найдены две замены в положениях 1 и 5 цепи, которые, как будет показано ниже, имеют важное биологическое значение. Ландштейнером была описана еще одна главная система групп крови, обозначенная как MN. Для идентификации соответствующих антигенов была использована антисыворотка, полученная после иммунизации кроликов эритроцитами одного индивидуума. Антитела этой антисыворотки агглютинировали эритроциты лишь у некоторой части других индивидуумов. Если для иммунизации использовали эритроциты, которые не агглютинировались первоначальной антисывороткой, то получаемые антисыворотки агглютинировали эритроциты лишь тех лиц, которые также не реагировали с первоначальной антисывороткой. Обнаруженные с помощью обоих типов антисывороток антигены поверхности эритроцитов оказались продуктами двух аллелей: M и N. Сейчас уже хорошо известно, что различия в антигенности по MN-группе обусловлены по крайней мере частично структурой участка пептидной цепи гликофорина А между остатками аминокислот 1 и 5. Так у индивидуумов, имеющих антиген M, эта последовательность следующая:

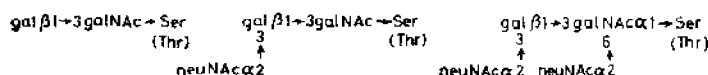
Ser. Ser. Thr. Thr. Gly

У индивидуумов с антигеном N обнаружены две аминокислотные замены:

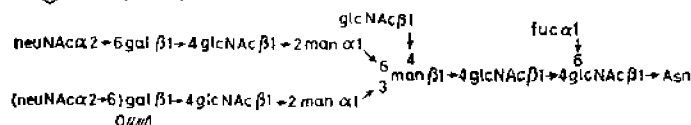


А

◇ O-ВЛИКАНЫ



⬡ N-ВЛИКАНЫ



Б

Рис. 2.19. А — первичная структура гликофорина А; показаны гликозилированные аминокислотные остатки. Б — общая схема строения углеводных цепей.

Leu. Ser. Thr. Thr. Glu

Для проявления антигенных свойств имеют существенное значение О-гликаны, которые присоединены к аминокислотным остаткам, отмеченным звездочкой. Возможно, эти углеводы способствуют поддержанию той необходимой конформации пептидной цепи, которая узнается специфическими антисыворотками. Другой важной областью цепи гликофорина А является участок между остатками 73 и 95, где расположены аминокислоты с нейтральными или неполярными боковыми цепями. Этот домен вдается в липофильный бислой мембраны, причем одна часть полипептидной цепи располагается по одну сторону мембраны, а другая — по другую ее сторону. Аминоконцевая часть цепи, локализованная снаружи, очень богата углеводными цепями двух основных типов. Здесь расположены 15 О-гликанов, которые представляют собой ди-, три- или тетрасахариды, связанные через остаток N-ацетилгалактозамина с серином или треонином. Эта структура сходна с структурой уже обсуждавшихся О-гликанов, поскольку также содержит последовательность галактозил $\beta 1 \rightarrow 3$ N-ацетилгалактозамина. К одному или обоим этим остаткам может присоединяться по остатку сиаловой кислоты. Подобные олигосахариды встречаются не только в гликофоре, но и в других растворимых гликопротеинах, например в фетине — основном гликопротеине сыворотки плода. Более сложные углеводные цепи присоединены к единственному остатку аспарагина пептидной цепи гликофорина. Они имеют ряд общих черт с N-гликанами растворимых гликопротеинов. Так, остаток β -маннозы коровой области присоединен к хитобиозе [20]. К остатку β -маннозы присоединены два остатка α -маннозы, к которым в свою очередь прикрепляются N-ацетилгалактозаминовые последовательности. Концевыми остатками последних являются сиаловая кислота и фукоза. К центральному остатку β -маннозы ($\beta 1 \rightarrow 4$)-связью присоединен также остаток N-ацетилглюкозамина, как и в гибридных цепях гликопептидов овальбумина (рис. 2.7).

Первичная структура минорных гликофоринов В и С, по-видимому, сходна с таковой гликофорина А, хотя их

цепи короче. Сложные олигосахаридные цепи у них отсутствуют, что указывает на делецию участка пептидной цепи с Asp-26 (рис. 2.19). Еще неясно, происходит ли эта делеция после того, как синтез цепи завершен, или же имеются отдельные гены, кодирующие полипептидные цепи каждого из трех гликофоринов.

2.6.2. Мембраны эритроцитов

Поскольку гликопротеины или простые белки способны встраиваться в мембраны, то требуется объяснить, каким образом полипептид, состоящий из многих аминокислот с заряженными боковыми цепями, взаимодействует со структурой, построенной из липидов. Скорее всего белки используют тот же принцип, что и липиды, которые являются *амфипатическими молекулами*, содержащими полярную часто заряженную группу и гидрофобную хвостовую часть из жирной кислоты. Липиды располагаются в бислое мембраны таким образом, что полярные группы выходят наружу, а цепи жирных кислот направлены внутрь и образуют непроницаемый гид-

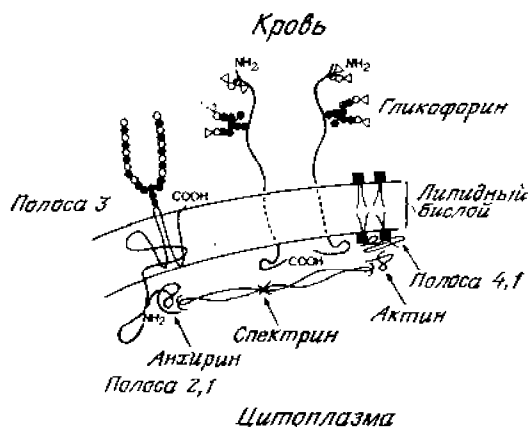


Рис. 2.20. Схематическое изображение некоторых белков в мембране эритроцитов человека. Обозначения моносахаридов: ● — glcNAc; ○ — man; ○ — gal; ○ — galNAc; ▽ — neuNAc. У гликофорина показан лишь один из пятнадцати O-гликанов. Показаны головки молекул фосфолипидов (■). (Из работы [21] с изменениями.)

рофобный слой. В связанных с мембранами полипептидах, как, например, в гликофореине, имеются участки цепи с неполярными боковыми группами, которые проникают в саму мембрану. Согласно ряду данных, домен гликофореина А, богатый углеводами, расположен на наружной поверхности эритроцита, тогда как карбоксильный концевой участок цепи, содержащий большое количество кислых аминокислот, выходит в цитоплазму (рис. 2.20). Известно, что несколько других мембранных гликопротеинов имеют подобную организацию. Однако данные, полученные при изучении второго главного компонента мембран эритроцитов человека, заставляют относиться с осторожностью к предположению, что все гликопротеины располагаются в мембране согласно столь простой модели. Так называемый белок «полосы 3» участвует в транспорте анионов через мембраны эритроцитов человека. Полная аминокислотная последовательность этого белка еще не определена, но установлено, что его полипептидная цепь проходит через липидный бислой не один, а несколько раз (рис. 2.20). Аминоконцевой участок цепи проникает в цитоплазму, тогда как карбоксиконцевой участок, содержащий гликаны, выходит на наружную поверхность клетки. Но основной принцип, установленный ранее для гликофореина, прослеживается и в этом случае — определенные участки белка находятся вне гидрофобной внутренней части мембраны. Эти наружные участки полипептидной цепи, как полагают, способны взаимодействовать с другими белками. Имеются, например, веские доводы в пользу того, что глобулярный белок — *анхирин* избирательно связывается с аминоконцевой частью белка «полосы 3». В свою очередь анхирин, по-видимому, взаимодействует с фибриллярным белком цитоплазмы эритроцитов — *спектрином*. Сетка из спектрина выстилает изнутри эритроцитарную мембрану, что придает определенную жесткость всей структуре и поддерживает характерную двояковыпуклую конфигурацию эритроцита. Для сохранения такой формы клетки, вероятно, важно и присутствие актина на цитоплазматической стороне мембраны. Спектрин, вероятно, связывается с актином или его тетрамером в месте, удаленном от участка связывания анхирина. Сам актин, вероятно,

прикреплен к мембране через еще один белок эритроцитов, так называемый белок «полосы 4.1». Последний обладает определенным сродством к полярным боковым группам фосфолипидов и поэтому может способствовать взаимодействию тетрамеров актина с внутренней стороной мембраны эритроцитов [21].

Изложенные данные помогают понять, каким образом относительно просто устроенная мембрана может стать при участии компонентов мышечного аппарата более жесткой, что необходимо для принятия клеткой необычной формы, требующей затраты энергии. Вполне очевидно, какое большое значение это имеет для сохранения определенной морфологии клетки и ее подвижности [22]. Некоторые из этих вопросов кратко рассматриваются в последней главе.

3. Биосинтез

3.1. Гликозилтрансферазы

Ферменты, непосредственно участвующие в биосинтезе N- и O-гликанов гликопротеинов, известны под общим названием *гликозилтрансферазы*. В общем виде реакция, катализируемая гликозилтрансферазой, показана на рис. 3.1: моносахаридный остаток переносится с активи-

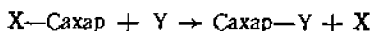


Рис. 3.1. Реакция, катализируемая гликозилтрансферазой.

рованного высокоэнергетического производного (X) на соответствующий акцептор (Y). Акцептором может служить остаток аспарагина, серина, треонина или гидроксизина в полипептидной цепи или углеводная последовательность неполностью синтезированного гликана. Реакция переноса моносахарида может повторяться, например, при биосинтезе гликогена, когда остаток глюкозы переносится с высокоэнергетического производного на невосстанавливающий конец растущей полисахаридной цепи (Y). Гликолипиды образуются подобным же образом — путем переноса первого моносахарида на первичную гидроксильную группу церамида, вслед за чем происходит присоединение последующих моносахаридов.

Обычно индивидуальные гликозилтрансферазы обладают высокой специфичностью в отношении групп X и Y. По существу, эти ферменты находятся среди тех биологически активных белков, методы исследования и характеристики которых разработаны еще недостаточно. Несмотря на это, некоторые аспекты механизма действия ряда гликозилтрансфераз уже изучены, и многие из этих ферментов удается получить в гомогенном виде.

3.2. Доноры

Непосредственными донорами моносахаридов в реакциях гликозилирования служат α - или β -гликозилэфиры нуклеотидов, обозначаемые как *нуклеотидсахара* (рис. 3.2). Нуклеотидным компонентом этих соединений

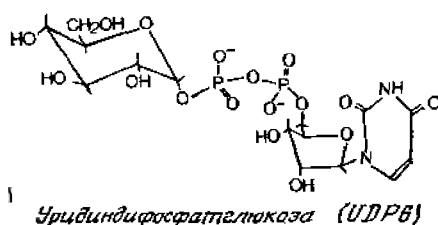


Рис. 3.2. Нуклеотидсахара.

Сахар	Активированная форма	Аномерная форма
Галактоза	UDP gal	α
Манноза	GDP man	α
N-ацетилглюкозамин	UDP glc NAc	α
N-ацетилгалактозамин	UDP gal NAc	α
Фукоза	GDP fuc	β
N-ацетилнейраминовая кислота	CMP neu NAc	β
Ксилроза	UDP xyl	α
Глюкуроновая кислота	UDP glc UA	α

могут служить уридин, гуанин или цитидин, представленные в нуклеотидсахарах, в виде эфиров пиррофосфорной кислоты, за исключением производных сиаловых кислот, в которых обнаружена фосфодиэфирная связь между остатком рибозы в нуклеотиде и сиаловой кислотой. Эти нуклеотидсахара — главные соединения, участвующие в гликозилировании белков. Однако в природе существуют и другие производные; например, у растений глюкоза переносится уридиндифосфатом (UDP), аденозиндифосфатом (ADP) или гуанозиндифосфатом (GDP), а у бактерий — UDP, тимидиндифосфатом (TDP) и цитидиндифосфатом (CTP), причем все они вовлекаются в биосинтез сложных углеводов.

Нуклеотидсахара, в состав которых входят глюкоза, манноза и N-ацетилглюкозамин, синтезируются специфическими синтетазами с использованием α -гликозилфосфатов и нуклеотидтрифосфатов с одновременным выделением пирофосфата (рис. 3.3, А).

Хотя *in vitro* эти реакции легко обратимы, в клетке они становятся практически необратимыми в результате

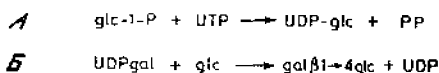


Рис. 3.3. Биосинтез нуклеотидсахара и дисахарида лактозы.

быстрого гидролиза пирогосфата пирогосфатазами. Образующиеся при этом нуклеотидсахара включаются во вторичные ферментативные реакции: UDP-глюкоза, например, подвергается эпитеризации по С-4 с образованием UDP-галактозы и карбоксилированию по С-6 с образованием UDP-глюкуроновой кислоты, которая далее может быть декарбоксилирована с образованием UDP-ксилозы. Подобным же образом UDP-N-ацетилгалактозамин путем эпитеризации по С-4 превращается в UDP-N-ацетилглюкозамин, тогда как GDP-манноза подвергается восстановлению по С-6 с образованием GDP-фукозы. Могут происходить и дальнейшие инверсии конфигурации: GDP-D-манноза превращается в GDP-L-фукозу и L-фукоза всегда обнаруживается в гликопротеинах.

Синтез активированных сиаловых кислот отличается от только что описанной общей реакции: а) в синтез включаются сиаловые кислоты (N-ацетил-, N-гликолил- или N,O-полиацилпроизводные) и СТР, что приводит к образованию монофосфатных производных сиаловой кислоты с сопутствующим удалением пирогосфата; б) в отличие от других синтетаз нуклеотидсахаров, присутствующих в цитоплазме, синтетаза СМР сиаловой кислоты преимущественно находится в клеточных ядрах.

Моносахаридные части нуклеотидсахаров переносятся на соответствующие акцепторы с образованием вполне определенных гликозидных связей. Простейшей иллюстрацией таких трансферазных реакций является синтез лактозы (рис. 3,3,Б). Лактозо-синтаза или UDP-галактоза: глюкоза — галактозилтрансфераза катализирует вторую стадию (Б) реакции и, подобно всем известным гликозилтрансферазам, строго специфична в отношении донора; GDP-галактоза, а также другие нуклеотидные производные галактозы не могут заменить UDP-галактозу в такой реакции.

3.3. Сборка N-гликанов

Как мы уже видели, структура N-гликанов в гликопротеинах чрезвычайно разнообразна. Строение гибридных и сложных типов цепей маннозосодержащих олигосахаридов было описано в гл. 2. Несмотря на такое структурное разнообразие, биосинтез N-гликанов большинства (а возможно, и всех) гликопротеинов происходит с использованием общего промежуточного липида полиизопренольного типа — *долихола* [23, 24]. Этот путь удивительно консервативен в процессе эволюции [24].

3.3.1. Липиды-переносчики

Роль полиизопренолов в гликозилировании была впервые установлена при изучении биосинтеза некоторых полимеров клеточной стенки бактерий: полисахариды, несущие антигенно-активные видоспецифические последовательности углеводов, исследовали Филипп Роббинс (Robbins) и его сотрудники, а структуру пептидогликана из клеточной стенки — Жак Строминджер (Strominger) и его группа. Позднее выдающийся аргентинский биохимик Луис Лелуар (Leloir) представил убедительные данные о том, что подобные изопренольные переносчики участвуют в гликозилировании белков.

В общем виде структура активного полиизопренола показана на рис. 3.4. Значение n варьирует, но для тканей животных она колеблется от 17 до 22. Концевое изопреновое звено насыщено и несет первичную гидроксильную группу, которая в активной форме фосфорилирована. Эта реакция осуществляется специфической СТР-зависимой киназой. Когда экстракты из разнообразных клеток животного происхождения, а также насекомых, растений и некоторых низших эукариотов (таких, как дрожжи, определенные виды грибов и простейшие) инкубировали с долихофосфатами и GDP-маннозой или UDP-глюкозой, происходило высвобождение UDP или GDP и образование растворимых в органических растворителях производных сахаров. Остатки сахаров связываются с полиизопренолами фосфодиэфирной связью, которая имеет β -конфигурацию (рис. 3.4). Поскольку в нуклео-

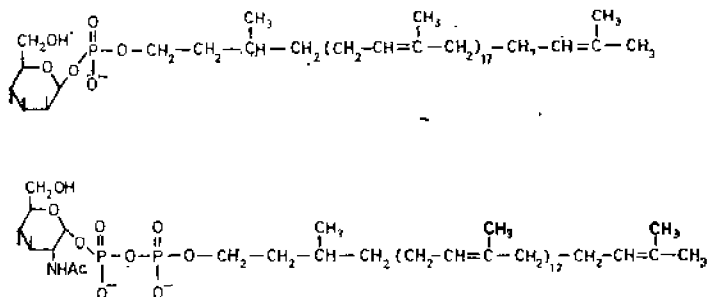
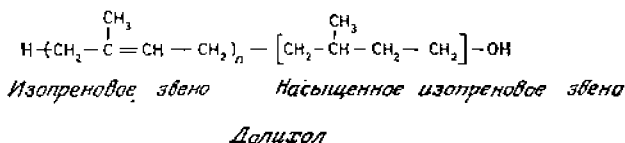


Рис. 3.4. Структура долихолов и фосфодолихилмоносахаридных производных, активных в биосинтезе гликопротеинов.

тидсахарах имеется связь в α -конфигурации, то образование долихолфосфатсахаров происходит с обращением связи при C-1. В отличие от этого N-ацетилглюкозамин-1-фосфат переносится с UDP-N-ацетилглюкозамина на долихолфосфат с отщеплением UMP (рис. 3.4). Следовательно, α -конфигурация сахарного звена сохраняется в долихолпирофосфат-N-ацетилглюкозамине.

Простейшие производные долихолов, приведенные на рис. 3.4, отнюдь не единственные липофильные соединения, синтезируемые клеточными экстрактами. Лелуар сделал фундаментальное открытие, обнаружив производные долихолфосфатов с необычной растворимостью, и показал, что в этих производных присутствуют олигосахариды, присоединенные пирофосфатной связью к первичному гидроксиду долихола. Эти данные подтвердились на примере многих типов клеток и тканевых экстрактов, а впоследствии была установлена полная последовательность реакций, включающих долихолфосфаты и

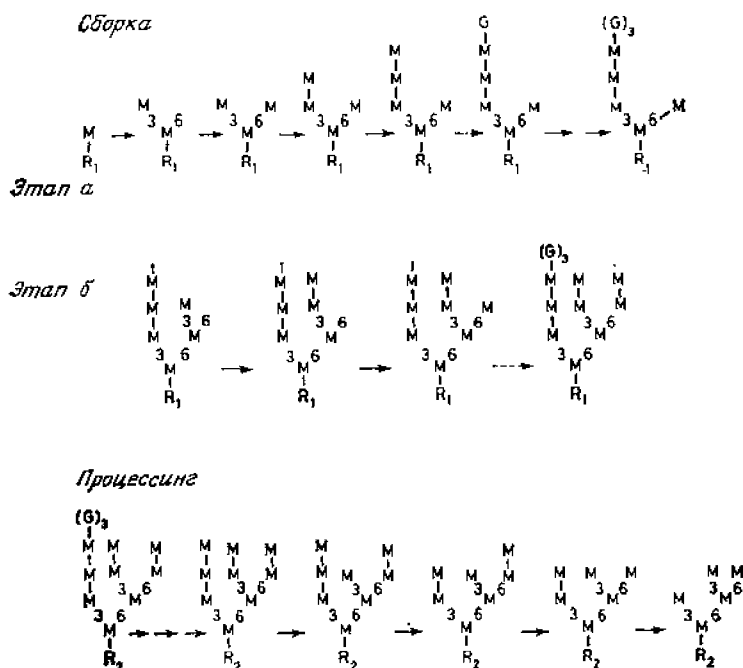


Рис. 3.6. Сборка олигоманнозидилидов и стадии процессинга СНО-яйцеклеток китайского хомячка. R_1 — $\text{glcNAc}\beta 1 \rightarrow 4\text{glcNAc}$ -пирофосфатдолихол. R_2 — $\text{glcNAc}\beta 1 \rightarrow \text{glcNAc}$ Asp. Положение остатков маннозы (М) и глюкозы (G) в цепи показано на рис. 3.5. Этап а — минорный путь, этап б — главный путь.

замина с UDP-N-ацетилглюкозамина с образованием $(\beta 1 \rightarrow 4)$ -связи. После этого следует присоединение β -маннозильного остатка в положение C-4 этого нового звена. Донором маннозы в этой реакции служит GDP-манноза. Следующие этапы биосинтеза заключаются в переносе восьми остатков маннозы с образованием α -связи с долихолом и трех остатков глюкозы, что приводит к образованию уникальной разветвленной структурой [23, 24]. В настоящее время эти маннозилтрансферазы еще не удается получить в очищенном виде. Однако из кинетических данных, полученных в опытах с цельными

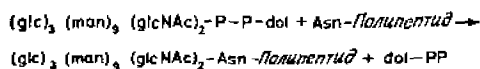


Рис. 3.7. Последние стадии гликозилирования остатков аспарагина в белках.

клетками, вполне очевидно, что присоединение α -маннозильных звеньев является высокоупорядоченным процессом (рис. 3.6), вероятно закрепленным в процессе эволюции. В первую очередь с центральным β -маннозильным звеном связывается ($\alpha 1 \rightarrow 3$)-маннозильный остаток, а затем ($\alpha 1 \rightarrow 6$)-маннозильный остаток. Боковая ветвь, содержащая α -маннозильный остаток, присоединившийся первым, далее удлиняется на два ($\alpha 1 \rightarrow 2$)-маннозильных звена, прежде чем происходит сборка полиманнозной цепи у второй ветви. И опять ($\alpha 1 \rightarrow 3$)-связанная ветвь собирается раньше, чем ($\alpha 1 \rightarrow 6$)-связанная ветвь; в конце этого процесса присоединяется глюкоза [25]. Весьма вероятно, что для этих стадий биосинтеза требуются различные α -маннозилтрансферазы и три глюкозилтрансферазы.

В клетках со специально заблокированным синтезом долихолфосфатманнозы образуются только укороченные варианты липидных промежуточных продуктов, содержащие четыре остатка маннозы (рис. 3.5). В нормальных клетках такие укороченные долихолфосфатманнозы являются лишь минорными компонентами. Из этого следует, что первые α -маннозильные остатки переносятся от GDP-маннозы, а последующие четыре остатка происходят от долихолфосфатманнозы [26, 27]. Остальные стадии сборки заключаются в присоединении скорее всего из долихолфосфатглюкозы трех остатков глюкозы к одной из ветвей структуры, богатой маннозой. Главный конечный продукт (рис. 3.5) служит прямым предшественником N-гликанов в гликопротеинах: олигосахаридная часть липидного промежуточного продукта переносится целиком (в виде единого блока) на остаток аспарагина в полипептидном акцепторе. Долихолпирофосфаты удаляются и, возможно, возвращаются в результате дефосфорилирования в общий пул долихолов (рис. 3.7).

Фермент, способный переносить такой блок, обнаружен во многих тканях, активно синтезирующих гликопротеины. Этот фермент удивительно универсален. Ферментные препараты из одного источника проявляют активность по отношению к различным акцепторам, полученным из этой же ткани или из совершенно иного источника. Еще более удивительно, что короткие пептиды, содержащие аспарагин, тоже способны выполнять в этой реакции роль акцепторов [28, 29]. Когда сравнивали акцепторную активность *развернутой* рибонуклеазы и α -лактальбумина с акцепторной активностью синтетических пептидов, последовательность которых была идентична последовательности вокруг гликозилируемого аспарагина соответствующих полипептидов данных гликопротеинов, то акцепторная активность таких синтетических пептидов была высокой (табл. 3.1). Однако активны были не все пептиды, а только те из них, которые имеют последовательность Asn-x-Ser или Thr, где x может быть практически любой аминокислотой, кроме пролина и, возможно, аспарагиновой кислоты (табл. 3.1). Для того чтобы функционировать в качестве акцептора, остатки аспарагина и гидроксиаминокислот должны

Таблица 3.1. Требования к акцептору для осуществления переноса олигосахаридов [28, 29]

Синтетические пептиды	Относительная активность, %
РНКаза (Asn ³⁴ -Leu ³⁵ -Thr ³⁶)	100
N ^α -ацетил Asn-Leu-ThrNHCH ₃	473
N ^α -ацетил Asn-Leu-Thr Lys	293
Ser-Arg Asn-Leu-Thr-Lys	120
N ^α -ацетил Asn-Leu-Thr	5
Asn-Leu-Thr-Lys	1
Asn-Leu-Thr	1
α -Лактальбумин (Asn ⁴⁵ -Gln ⁴⁶ -Ser ⁴⁷)	100
N ^α -ацетил Asn-Leu-Ser-Leu	18
Asn-Leu-Ser-Leu	<1
Tyr-Asn-Leu-Thr-Ser-Val	100
Tyr-Asp-Leu-Thr-Ser-Val	0
Tyr-Gln-Leu-Thr-Ser-Val	0
Tyr-Asn-Leu-Val-Ser-Val	0
Tyr-Asn-Pro-Thr-Ser-Val	0

иметь заблокированные аминок- и карбоксильную концевые группы, а то, что остаток аспарагина существен для акцепторной активности, неудивительно, так как именно этот остаток гликозилируется. Таким образом, аналогичные пептиды, содержащие остатки глутамина или аспарагиновой кислоты вместо аспарагина, полностью лишены активности. Требования к акцептору при переносе олигосахарида на полипептид, установленные в этих исследованиях, всецело зависят от последовательности в пептиде вокруг гликозилируемого остатка аспарагина в данном гликопротеине [30]. Многие из таких последовательностей теперь известны, и во всех случаях Asn-x-Ser или Thr локализованы внутри гликозилированной полипептидной цепи. Ингибиторный эффект пролина был также предсказан на основе рассмотрения гликозилированных участков в гликопротеинах. Причина такого ингибирования неизвестна, но одно из соображений заключается в том, что между амидом аспарагина и гидроксильной группой серина или тронина может возникать водородная связь, тогда как остаток пролина препятствует возникновению такой связи. Возможно, что такая связь необходима, чтобы индуцировать соответствующую конформацию для замещения амидной группы подходящей олигосахаридной, например, путем модификации ионизации амидной группы.

Хотя совершенно ясно, что для переноса олигосахарида на аспарагин требуется наличие трипептида с определенной последовательностью, этого еще не достаточно. Во многих белках имеются требуемые последовательности, однако они или совсем не гликозилированы, или не полностью гликозилируются в процессе нормального клеточного биосинтеза. Фермент поджелудочной железы — рибонуклеаза — прекрасный пример такого явления. Только 20% белковых молекул гликозилированы по аспарагину-34 (табл. 3.1), тогда как остальные белки остаются негликозилированными и могут служить прекрасными акцепторами *лишь при условии*, что их полипептидная часть вначале денатурируется (развертывается) соответствующими химическими воздействиями (например, гидролизом бисульфидных связей и карбоксиметилированием в денатурирующих условиях). По-

добно этому, α -лактальбумин имеет два узнаваемых трипептида Asn-Gln-Ser и Asn-Thr-Ser. Однако большинство этих последовательностей не гликозилированы, и лишь небольшая их часть гликозилирована по первому центру гликозилирования. Денатурированные белки хорошо гликозилируются по любому из этих трипептидов, а синтетические пептиды, приготовленные на основе данных, полученных при изучении их последовательностей, в свою очередь — прекрасные акцепторы. Из этого можно сделать следующие выводы: 1) трипептид должен быть экспонирован соответствующим образом на поверхности молекулы белка для того, чтобы в процессе сборки гликопротеина в клетке могло быть осуществлено гликозилирование; 2) существующий механизм контроля позволяет гликозилировать только те остатки аспарагина, которые встречаются в последовательности, завершающей формирование поверхности белка после биосинтеза и складывающейся из полностью гликозилированного полипептида. Соввершенно ясно, что объемные углеводные группы *всегда* существуют на поверхности белковой глобулы и обычно находятся в участках пептидов с бета-складчатостью. Такие конформации особенно предпочтительны для введения гликозилированных последовательностей.

Как уже отмечалось, при особых обстоятельствах можно предотвратить полную сборку глюкозосодержащих промежуточных липидов в целых клетках. Однако образование N-гликозилированных белков все же осуществляется в таких клетках, и тогда возникает вопрос о специфичности гликозилтрансфераз, катализирующих перенос олигосахаридов на полипептид. По-видимому, некоторые долихолпирофосфатолигосахариды могут функционировать в качестве промежуточных соединений в такой реакции. Даже долихолпирофосфо-N-ацетилглюкозаминил- β 1 $\rightarrow$ 4N-ацетилглюкозамин используется ферментом для переноса хитобиозного звена на синтетический пептид, хотя эффективность такого переноса снижена [28]. Все это наряду с тем фактом, что в клетках в нормальных условиях имеются большие глюкозосодержащие липиды-переносчики, которые в основном представляют собой связанные с долихолом олигосахариды,

вполне определенно свидетельствуют о том, что N-гликозилирование в клетках осуществляется преимущественно путем переноса таких глюкозосодержащих олигосахаридов на полипептид. Прямым доказательством в пользу такого предположения стали эксперименты с импульсной меткой, проведенные с нормальными клетками или с клетками, инфицированными вирусом. Из этих исследований стало ясно, что олигосахарид, изначально перенесенный на полипептид в клетках или в вирусных гликопротеинах, идентичен по размеру и по структуре большому глюкозосодержащему долихольному промежуточному соединению. Глюкоза полностью собранного промежуточного переносчика, видимо, является необходимым фактором, контролирующим эффективность переноса на белки, по крайней мере в клетках животных [31].

3.3.2. Процессинг

При изучении олигосахаридной структуры большого липидного промежуточного продукта (рис. 3.5) было обнаружено, что он имеет много общего с известными уже N-гликанами в гликопротеинах. Коровья область состоит из β -маннозильного остатка, связанного с хитобиозным звеном, обычно обнаруживаемым в N-гликанах. Кроме того, окружение α -маннозильных остатков, присоединенных к этому кору, идентично липидному промежуточному продукту, как, например, у большого олигоманнозильного звена в IgM (рис. 2.8). Однако следует упомянуть ряд различий в строении предшественника и гликанов гликопротеинов. Во-первых, связанные с липидом олигосахариды содержат три остатка глюкозы, тогда как в олигосахаридах, связанных с аспарагином, глюкоза обычно никогда не обнаруживается. Во-вторых, необходимо объяснить, как возникают многие другие олигоманнозные структуры в гликопротеинах, например такие, как в овальбумине (рис. 2.6). И наконец, как собираются такие сложные N-гликаны, которые входят в состав орозомукоида? В настоящее время кажется вполне вероятным, что все эти структуры образуются в результате переноса от общего глюкозосодержащего

производного долихола. Сложные олигосахариды, связанные с липидными промежуточными продуктами, после переноса на полипептидную цепь подвергаются интенсивной модификации. Такие модификации осуществляются в процессе сложной серии реакций, называемой *процессингом*. Часто после присоединения к полипептиду остаток глюкозы удаляется высокоспецифической α -глюкозидазой [32]. Остатки α -маннозы удаляются набором специфических α -маннозидаз [33], возможно, в определенной последовательности [34], которая, по крайней мере в отдельных случаях, отличается от таковой при их сборке в липидном промежуточном продукте (рис. 3.6). В ходе процессинга (рис. 3.6) многие олигоманнозидные гликаны обнаружены как стабильные компоненты уже готовых сформированных гликопротеинов, как, например, участок (б) иммуноглобулина М (рис. 2.8). Вероятно, контролируемый процессинг обуславливает появление набора олигоманнозидных структур гликопротеинов, хотя не исключено, что в этом участвуют более сложные пути биосинтеза; например, полный процессинг, приводящий к появлению структур с пятью остатками маннозы, сопровождается ресинтезом гликанов с большим содержанием манноз. Возможно также, что другие пути процессинга объясняют наличие различных олигоманнозидных структур в участке (а) иммуноглобулина М (рис. 2.8). До настоящего времени ничего не известно о факторах, контролирующих процессинг, и о том, как осуществляется нужное отщепление остатков маннозы в соответствии с определенным участком гликозилирования у одного и того же полипептида. Такие вариации в соответствии с типом клетки или видом животного могли бы приводить к образованию дискретных цепей гликанов, характерных для этих клеток, и способствовать структурному разнообразию N-гликанов.

3.3.3. Реакции терминирования

До сих пор мы обсуждали сборку N-гликанов олигоманнозидного типа, содержащих до девяти остатков маннозы. Как же тогда образуется другой основной класс N-гликанов, содержащих периферические остатки сиало-

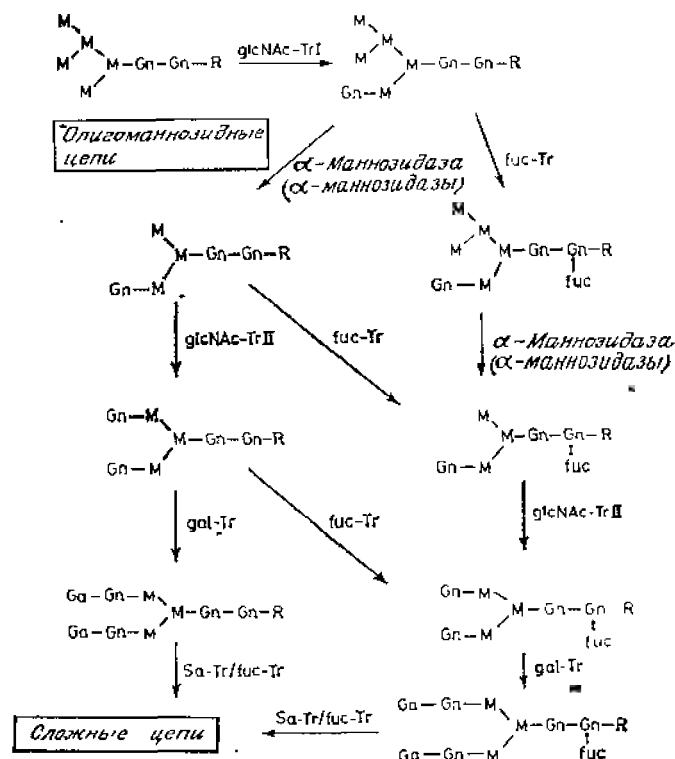


Рис. 3.8. Биосинтез N-гликанов, содержащих галактозу. Тг — трансфераза (значения сокращений см. в табл. 1.1).

вых кислот и галактозы и дополнительные остатки N-ацетилглюкозамина? Как осуществляется контроль за присоединением фукозы? Интересно, что в олигоманнозидных гликанах не обнаруживается фукоза, присоединенная к хитобioзной последовательности коровой области. К тому же фукоза часто встречается в структурах $\text{gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{glcNAc}$ невозстанавливающего конца сложных N-гликанов, так же как и сialовая кислота. Структур, в которых последовательность моносахаридов была бы замещена как сialовой кислотой, так и фукозой, не обнаружено.

Отправной точкой сборки сложных N-гликанов является структура, содержащая пять остатков маннозы (рис. 3.8). Гарри Шахтер (Schachter) и его сотрудники идентифицировали специфическую β -N-ацетилглюкозаминилтрансферазу, которая использует этот субстрат, перенося остаток моносахарида с UDP-N-ацетилглюкозамина на α -маннозное звено с образованием ($\alpha 1 \rightarrow 3$)-гликозидной связи в коровой области [35]. Фермент известен как N-ацетилглюкозаминилтрансфераза I, или *glcNAc-TrI*. Эксперименты с использованием бесклеточной системы или с очищенными ферментами показали, что возможным субстратом данного фермента является структура с пятью остатками маннозы, хотя и другие олигоманнозидные гликопептиды и гликопротеины могут служить акцепторами в этой реакции. Присоединение остатка N-ацетилглюкозамина запускает дальнейший процессинг олигосахарида, образующегося под действием α -маннозидазы. Эта α -маннозидаза (или α -маннозидазы) была получена в очищенном виде. Установлено, что она гидролизует ($\alpha 1 \rightarrow 3$)- и ($\alpha 1 \rightarrow 6$)-связи, причем маннозил-($\alpha 1 \rightarrow 2$)-связи не расщепляются под действием этого фермента, который явно отличается от ферментов, участвующих в более ранних реакциях процессинга (рис. 3.6). Продуктом действия α -маннозидаз является асимметричная последовательность, содержащая два α -маннозильных остатка, связанных с коровой областью. Такая структура служит субстратом для другой специфической N-ацетилглюкозаминилтрансферазы II, или *glcNAc-TrII*. Последующие реакции включают перенос остатка галактозы с UDP-галактозы на остатки N-ацетилглюкозамина по C-4 с образованием N-ацетиллактозаминов, типичных для многих сложных N-гликанов. Недавно была описана [36] галактозилтрансфераза, способная, как и предполагалось, синтезировать последовательность $\text{gal}\beta 1 \rightarrow 3\text{glcNAc}$ в этих же участках моносахаридных цепей, так как такая последовательность была обнаружена в некоторых N-гликанах. Таким образом, *glcNAc*-трансфераза I является ключевым ферментом в превращении олигоманнозидных N-гликанов в сложные цепи.

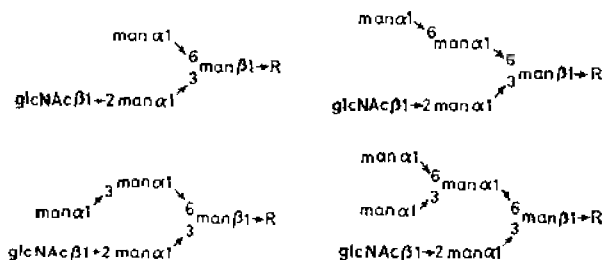


Рис. 3.9. Углеводные цепи бычьего родопсина. R — $\text{glcNAc}\beta 1 \rightarrow 4 \text{glcNAc}\beta 1 \rightarrow \text{Asp}$.

Другой тип контроля сборки N-гликанов обнаружен при биосинтезе родопсина — главного гликопротеина, составляющего мембраны дисков внешнего сегмента палочек сетчатки. Клетки, ответственные за биосинтез этого белка, по-видимому, содержат низкую α -маннозидазную активность, что и отражается в структуре N-гликана родопсина (рис. 3.9). Хотя очевидно, что в этих клетках образуется продукт N-ацетилглюкозаминилтрансферазы I и происходит процессинг, второй N-ацетилглюкозамин отсутствует.

Реакция, катализируемая N-ацетилглюкозаминилтрансферазой I, по-видимому, определяет другую важную модификацию гликана. В клеточных экстрактах была обнаружена фукозилтрансферазная активность, благодаря которой остаток фукозы присоединяется ($\alpha 1 \rightarrow 6$)-связью к остатку N-ацетилглюкозамина, соединенного с аспарагином [11, 35]. Эта трансфераза может действовать на структуру коровой области $\text{man}_3\text{glcNAc}_2\text{Asp}$ только тогда, когда хотя бы один из остатков N-ацетилглюкозамина присоединен к остатку α -маннозы. Другими словами, N-ацетилглюкозаминилтрансфераза I должна действовать до того, как соответствующая последовательность будет доступна для действия специфической фукозилтрансферазы (рис. 3.8). Это делает понятными данные, свидетельствующие о том, что такая связь отсутствует в N-гликанах, содержащих только маннозу.

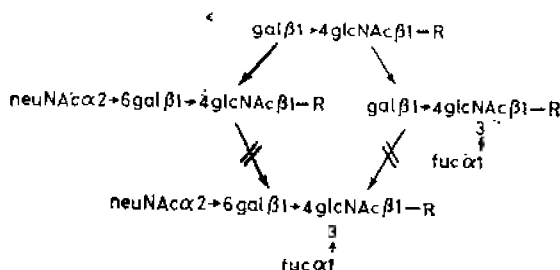


Рис. 3.10. Контроль конечных реакций при биосинтезе N-гликанов (R — см. рис. 3.9).

Конечные стадии сборки сложного N-гликана заключаются в присоединении сиаловых кислот и фукозы при помощи CMP-сиаловой кислоты и GDP-фукозы соответственно. Известно, что разные производные сиаловых кислот находятся на невозстанавливаемых концах N-гликанов и присоединены гликозидной связью по C-3 или C-6 предшествующих остатков галактозы. Различные сиалилтрансферазы, по-видимому, катализируют образование этих гликозидных связей. Дальнейшее структурное разнообразие затем накапливается благодаря модификации сиаловых кислот, например, в результате окисления N-ацетильных групп до N-гликольных групп или же благодаря присоединению O-ацетильных групп, которое может осуществляться после переноса сиаловых кислот на цепь гликана.

При изучении активности очищенной сиалилтрансферазы, образующей $(\alpha 2 \rightarrow 6)$ -гликозидные связи с галактозой, выявилось [38] конкурентное взаимодействие с фукозилтрансферазой (рис. 3.10). Концевые последовательности типа галактозил- $\beta 1 \rightarrow 4$ N-ацетилглюкозамин могут служить акцепторами либо сиаловой кислоты, либо фукозы. Эти две реакции взаимоисключающие, что проливает свет на недавно установленные структуры N-гликанов в α -амилазе слюнной железы (рис. 3.11). $\text{Fuc}\alpha 1 \rightarrow 3\text{GlcNAc}$ присутствует также в N-гликане орзоумукоида (рис. 2.1) и в других гликопротеинах.

Несколько главных проблем еще ждут своего решения. Во-первых, до сих пор не получено какой-либо ин-

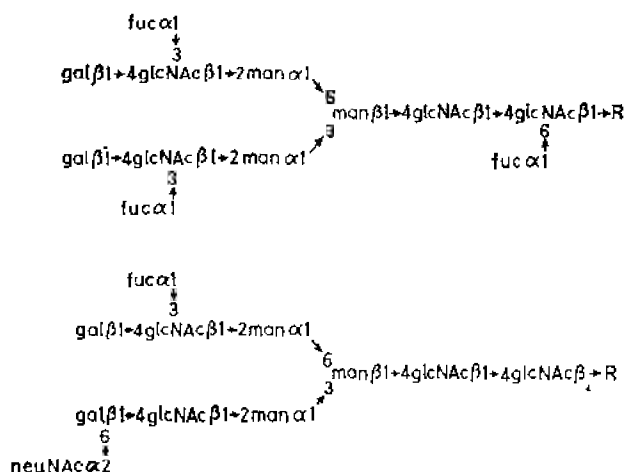


Рис. 3.11. Строение N-гликанов α -амилазы из околоушной железы [39].

формации о N-ацетилглюкозаминилтрансферазе, присоединяющей остатки к β -маннозным звеньям в гибридных структурах или по C-4 и C-6 остатка α -маннозы в высоковетвистых сложных N-гликанах, например в орозомукоиде (рис. 2.11). Однако очень вероятно, что это разные активности, отличающиеся от трансфераз I и II. Во-вторых, мы не представляем себе до настоящего времени, как процессинг и термминация контролируются в соответствии с положением аспарагинового остатка в полипептидной цепи.

3.4. Сборка O-гликана

Сборка O-гликанов лучше всего изучена в случае коротких углеводных цепей коллагенов и гликопротеинов, секретируемых подчелюстными железами. Для гликозилирования субъединиц коллагена требуются три фермента (рис. 3.12): лизин-гидроксилаза, галактозилтрансфераза, узнающая довольно протяженный участок пептидной последовательности вокруг гликозилируемого

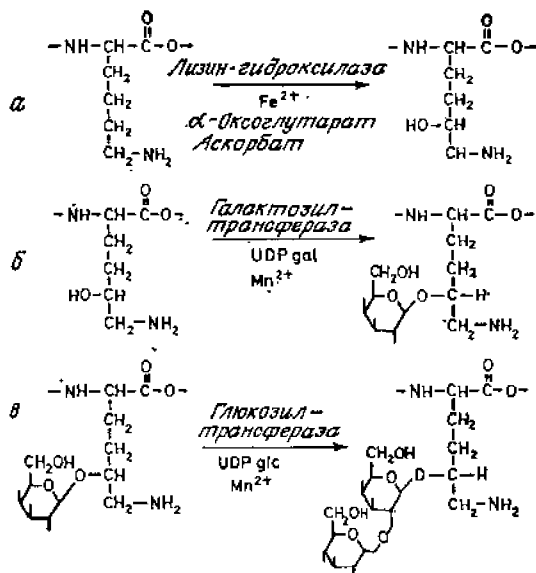
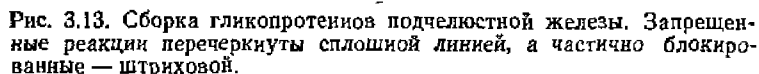


Рис. 3.12. Этапы гликозилирования коллагена.

остатка гидроксизина, и глюкозилтрансфераза (рис. 3.12; [40]).

Сборка О-гликанов гликопротеинов подчелюстных желез также включает в себя прямой перенос сахаров от нуклеотидных промежуточных продуктов, катализируемый мультиферментной системой. Первая гликозилтрансфераза (рис. 3.13, фермент 1), используя UDP-N-ацетилгалактозамин, устанавливает связь с остатками серина или треонина. Для действия этого фермента требуется наличие протяженного участка пептидной цепи вокруг гликозилируемых остатков аминокислот, в связи с чем большая часть полипептидов не может служить субстратом этого фермента. Интересное исключение составляет главный осповый белок мислина нервного волокна. Этот белок в норме не гликозилирован, и биологическое значение его акцепторной активности неизвестно. Синтетические пептиды, являющиеся аналогами последовательности в окружении треонина-98 миелиново-



го белка — единственной гликозилированной аминокислоты основного белка — были использованы для определения специфичности galNAc-трансферазы секрета подчелюстных желез (табл. 3.2).

Таблица 3.2. Условия, необходимые для гликозилирования остатка треонина [41]

Пептид (или белок)								Относительная акцепторная активность
Основной белок	мислина							1,0
94	95	96	97	98	99	100	101	
Val	Thr	Pro	Arg	Thr	Pro	Pro	Pro	2,5
	Thr	Pro	Arg	Thr	Pro	Pro	Pro	1,1
		Pro	Arg	Thr	Pro	Pro	Pro	1,2
			Arg	Thr	Pro	Pro	Pro	1,1
				Thr	Pro	Pro	Pro	0,1
				Thr	Pro	Pro		0
				Thr	Pro			0

Самым важным является то, что остаток треонина для гликозилирования должен быть внутренним остатком в цепи, поэтому наличие в пептиде большого количества остатков пролина облегчает этот процесс. Гликозилирование чрезвычайно специфично для треонина-98. Треонин-95 не является акцептором. Таким образом, свойства этой системы напоминают строгие требования N-ацетилглюкозаминилтрансферазы, участвующей в гликозилировании остатков аспарагина. По-видимому, высокое содержание пролина в полипептидах гликопротеинов подчелюстных желез обуславливает наличие большого числа остатков пролина вокруг каждой из многих гликозилированных оксикислот в этих молекулах. Продукт этой реакции (рис. 3.13, б) служит субстратом для конкурирующих ферментов 2 и 3: сиалилтрансферазы, присоединяющей остаток сиаловой кислоты с СМР_{neuNAc} к N-ацетилгалактозамину (рис. 3.13, в) и галактозилтрансферазы (рис. 3.13, д). В тканях с высокой активностью сиалилтрансфераз, например в железах овцы, накапливается дисахарид типа $neuNAc\alpha 2 \rightarrow 6galNAc$, поскольку он не является субстратом для галактозилтрансферазы. Продукт (рис. 3.13, д) служит субстратом для трех гликозилтрансфераз. Сиалилтрансфераза (фермент 3) образует трисахарид (ж), фукозилтрансфераза — вещество з, а N-ацетилглюкозаминилтрансфераза образует продукт е. Фукозилтрансфераза может взаимодействовать также с сиалированным трисахаридом (ж), причем обе фукозилированные структуры (з и к) являются субстратами N-ацетилгалактозаминилтрансферазы.

Согласно приведенным выше данным, эти фукозосодержащие структуры являются детерминантами группоспецифичности H, а N-ацетилгалактозаминилтрансфераза — продукт гена A, придающий O-гликану активность группы крови A. Третья трансфераза, активная по отношению к структуре д (рис. 3.13), по-видимому, должна быть высокоспецифичной. Хотя N-ацетилглюкозамин переносится с UDPglcNAc на остаток N-ацетилгалактозамина, связанного с полипептидом (рис. 3.13, е), для действия трансферазы существенное значение имеет остаток галактозы [42]. Даже замещение галактозы на фукозу (рис. 3.13, з) сильно подавляет последующий перенос

N-ацетилглюкозамина, дающий продукт *и*. Преимущественный путь синтеза структуры *и* осуществляется благодаря действию специфических фукозилтрансфераз на субстрат *е*. Взаимокопкурентная природа реакций фукозилирования и сиалирования, отмеченная ранее, здесь проявляется по-другому. Перенос фукозы на остаток галактозы в структуре *з* в значительной степени подавляет последующий перенос сиаловой кислоты на соседний моносахарид для образования структуры *к* [43]. Таким образом, предпочтительный путь для синтеза этого тетрасахарида следующий: $a \rightarrow b \rightarrow d \rightarrow ж \rightarrow к$.

Эти важные экспериментальные данные убедительно показали, почему в тканях типа подчелюстных желез овцы с относительно специфической галактозилтрансферазной активностью и высокой сиалилтрансферазной активностью обнаруживается только дисахарид $neuNAc\alpha 2 \rightarrow 6galNAc$. Кроме того, они объяснили образование длинных гликанов, оканчивающихся детерминантами групповой специфичности крови в гликопротеинах, секретируемых слюнными железами свиньи. Определенное соотношение активности сиалил- и галактозилтрансфераз наводит на мысль о наличии особого механизма контроля, обеспечивающего регуляцию количества длинных O-гликанов. Возможно, что появление N-ацетилглюкозамина, присоединенного ($\beta 1 \rightarrow 6$)-связью, включает механизм, обеспечивающий точную длину образующегося гликана (так называемый коровый участок продуктов с активностью антигенов группы крови, которые секретируются определенными клетками человека; рис. 2.16). Этот механизм включает в себя и присоединение других моносахаридов к концевой галактозе продукта, синтезированного с участием $glcNAc$ -трансферазы.

Синтез O-гликанов, присутствующих в гликофореине, фетуине (основном гликопротеине, синтезируемом печенью эмбриона) и во многих других гликопротеинах (рис. 2.19), может образовываться тем же путем, что и описанный выше. Специфическая сиалилтрансфераза, образующая последовательность $neuNAc\alpha 2 \rightarrow 3Gal$, была выделена в очищенном виде из печени свиньи и из других тканей [44, 43], что объясняет существование трисахарида $neuNAc\alpha 2 \rightarrow 3gal\beta 1 \rightarrow 3glcNAc$ (рис. 2.19).

Однако до сих пор остается неясным, как контролируется активность фермента, образующего ($\alpha 2 \rightarrow 6$)-связь в дисахариде $\text{neuNAc}\alpha 2 \rightarrow 6\text{galNAc}$ с последующим синтезом тетрасахарида, содержащего два остатка сиаловых кислот (рис. 2.19). Активности, аналогичной ферменту 3 (рис. 3.13), пока не обнаружено в печени — источнике феттина, и очевидно, этой сиалилтрансферазе в качестве акцептора требуется другой олигосахарид [44]. Трисахарид с одним остатком сиаловой кислоты в О-гликане (рис. 2.19), возможно, является важным промежуточным продуктом при сборке тетрасахарида О-гликана.

3.5. Локализация процесса гликозилирования в клетке

До сих пор мы рассматривали свойства специфических гликозилтрансфераз, проявляемые *in vitro*. Однако биосинтез гликопротеинов — высокоупорядоченный внутриклеточный процесс. В связи с этим нам теперь необходимо рассмотреть протекающий во времени процесс появления вновь образующихся гликопротеинов в ходе их сборки и локализацию в клетке реакций гликозилирования. Гликопротеины являются составной частью большинства, а возможно, и всех мембранных систем внутри клетки, и наряду с этим большинство, но отнюдь не все секретируемые белки относятся к гликопротеинам. Однако, вероятно, углеводы не являются необходимым сигналом для секреции, так как некоторые белки, например проколлаген, продолжают секретироваться из таких клеток, в которых гликозилирование заблокировано — либо вследствие генетической мутации метаболических путей, ответственных за гликозилирование, либо под действием различных ингибиторов гликозилирования белков. Самый широко используемый ингибитор такого рода — *туникамицин*, который препятствует синтезу долихолдифосфат-N-ацетилглюкозамина на первом этапе сборки N-гликанов. Однако недавние исследования, обсуждающиеся в гл. 4, действительно указывают на то, что предотвращение гликозилирования белка часто вызывает появление гликопротеинов в необычных местах внутри клетки или же ведет к секреции гликопротеинов, которые при нормальных условиях остались бы внутри

клеток. Упорядоченность событий в процессе гликозилирования приводит к правильному току гликопротеинов от места синтеза полипептидной цепи к их собственно терминальной стадии синтеза. Следовательно, важно знать, где в клетке осуществляется гликозилирование белка.

Вряд ли существуют сомнения в том, что полипептидная часть гликопротеинов образуется рибосомами, связанными с мембранной системой эндоплазматического ретикулаума («шероховатым» эндоплазматическим ретикулумом). Если к клеткам, участвующим в биосинтезе гликопротеинов, добавить радиоактивные моносахариды, то с помощью радиоавтографии срезов клетки или фракционирования субклеточных фракций можно легко показать, что присоединение N-ацетилглюкозамина и маннозы к полипептиду происходит в шероховатом эндоплазматическом ретикулуме. Пионером этих исследований является Клод Леблонд (Leblond) из Университета Мак-Гилла. Подобными же методами было показано, что фукоза, галактоза и N-ацетилманнозамин — непосредственный и специфический маркер для сиаловых кислот — присоединяются в основном в гладких мембранах, особенно в мембранах аппарата Гольджи. Эти наблюдения могут быть подтверждены прямыми определениями специфических гликозилтрансфераз в субклеточных фракциях, выделенных из разрушенных клеток. Например, в мембранах аппарата Гольджи обнаруживаются трансферазы, ответственные за сборку трисахаридов, содержащих сиаловую кислоту, галактозу и N-ацетилглюкозамин в N-гликанах, а также и за фукозилирование. Недавно было показано, что с помощью окрашенных специфических антител к галактозилтрансферазе в препарате целых клеток можно выявить плотный «колпачок», который представляет собой, очевидно, часть комплекса Гольджи [45]. В отличие от этого гликозилтрансферазы, стимулируемые долихолом, локализованы в шероховатом эндоплазматическом ретикулуме. Биосинтез гликопротеинов с учетом всех этих данных схематически показан на рис. 3.14.

Согласно модели, предложенной Блобелом и Добберштейном (Blobel, Dobberstein) [46], образующиеся поли-

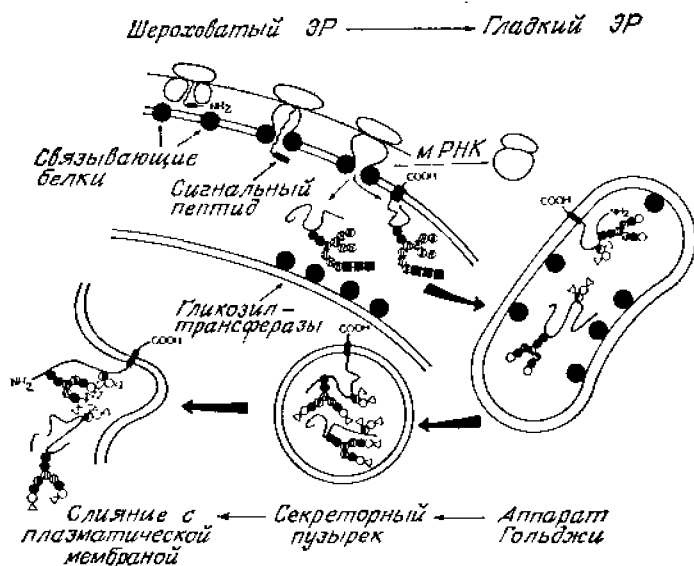


Рис. 3.14. Гипотетическая схема биосинтеза гликопротеинов. Обозначения моносахаридов: ● — glcNAc; ⊗ — man; ○ — gal; ▽ — сиаловые кислоты; ○ — galNAc; ■ — glc. ЭР — эндоплазматический ретикулум.

пептиды имеют сигнальную пептидную последовательность, обеспечивающую фиксацию рибосом на мембранах эндоплазматического ретикулума. Эта ассоциация стабилизирована специфическими мембранными белками эндоплазматического ретикулума, обладающими сродством к определенным участкам рибосом. Трансляция мРНК продолжается с векторной разгрузкой образующегося полипептида во внутреннее пространство цистерны шероховатого эндоплазматического ретикулума. На раннем этапе сигнальный пептид отщепляется в результате специфического протеолиза, после чего начинается свертывание полипептидной цепи и обнажается участок полипептида, доступный для гликозилирования. Гликозилирование происходит с использованием промежуточных соединений долихола и заключается в переносе олигосахарида $(glc)_3(man)_9(glcNAc)_2$ на обнаженные остатки аспарагина пептидной цепи. Трансфераза, переносящая

олигосахарид, тесно связана с мембраной [47]. Растворимые гликопротеины полностью высвобождаются во внутреннее пространство цистерны после окончания трансляции мРНК, тогда как будущие мембранные гликопротеины остаются интегрированными в мембранах эндоплазматического ретикулума. Связь с ними осуществляется с помощью гидрофобного пептидного участка, как и в случае с гликофоорином.

Следующая стадия в процессе биосинтеза гликопротеина заключается в превращении шероховатого эндоплазматического ретикулума в свободные от рибосом гладкие мембраны путем диссоциации от эндоплазматического ретикулума или же латеральной миграции гликозилированных белков в область эндоплазматического ретикулума, где имеется недостаток мембранных рибосомосвязывающих белков. Транспорт вновь синтезированных гликопротеинов в аппарат Гольджи, по-видимому, обеспечивается образованием пузырьков, покрытых (окаймленных) со стороны цитоплазмы белком клатрином [48]. Ранее предполагалось, что эти окаймленные *пузырьки* участвуют в осуществляемом путем эндоцитоза проникновении в клетку внеклеточного материала. Теперь становится очевиднее их роль во внутриклеточном транспорте. Мембраны аппарата Гольджи в свою очередь образуют различные везикулярные компартменты, включая лизосомы и секреторные пузырьки. Дальнейшее формирование N-гликанов осуществляется на этой стадии, так как гликозилтрансферазы, ответственные за дальнейшую сборку и терминацию N-гликанов, локализованы в мембранах аппарата Гольджи. Гликозидазы, осуществляющие процессинг (глюкозидазы, маннозидазы), выделяются вместе с фракцией гладких мембран. Имеют место и другие события, такие, как фосфорилирование N-гликанов, что, по-видимому, имеет чрезвычайно важное значение для непосредственного прохождения гликопротеинов во внутрь лизосом (разд. 4.3.2). Пузырьки, происходящие из аппарата Гольджи, опять покрываются клатрином, что необходимо для участия в экзоцитозе гликопротеинов. Затем они сливаются с плазматической мембраной, и продукты биосинтеза либо секретируются, либо остаются в качестве интегральных компо-

нентов поверхности мембраны. Отметим, что топология слияния приводит к асимметрии плазматической мембраны, наблюдаемой в эксперименте. Таким образом, гликозилированные участки пептидов, которые существуют внутри цистерн эндоплазматического ретикулума, появляются после слияния на наружной поверхности клетки.

Эта простая схема очень сложных процессов не может, конечно, пролить свет на такие специальные проблемы, как биосинтез гликопротеина полосы 3. Одна из возможностей состоит в следующем: сигнальный пептид некоторых вновь образованных полипептидов остается постоянно включенным в мембрану эндоплазматического ретикулума. Полипептид, находящийся на стадии элонгации, может продергиваться через мембрану эндоплазматического ретикулума несколько раз в процессе элонгации и в конечном итоге становится гликозилированным по С-концевым участкам.

Образование О-гликанов, по-видимому, является относительно поздним событием в биосинтезе [49]. Присоединение моносахаридов, непосредственно примыкающих к полипептиду, и сиаловых кислот, а также превращения N-ацетилнейраминовой кислоты в ходе реакций гидроксилирования и ацетилирования — все это реакции, ассоциированные с мембранами гладкого эндоплазматического ретикулума или мембранами аппарата Гольджи. Различная субклеточная локализация сборки N-гликанов коровой области и реакций терминации биосинтеза N-гликанов, с одной стороны, и сборки О-гликанов — с другой, позволяет объяснить существование разных механизмов их сборки. Такая тесная ассоциация новообразующегося полипептида с мембранами эндоплазматического ретикулума сопряжена, очевидно, с обязательным участием связанных с липидами промежуточных продуктов, в то время как более поздние события биосинтеза, в которых участвуют уже зрелые гликопротеины, осуществляются более простыми способами.

3.6. Контроль за биосинтезом гликана

3.6.1. Метаболический контроль

Покоящаяся клетка, такая, как покоящийся лимфоцит или фибробласт в среде, не содержащей сыворотки, сохраняет средний уровень биосинтеза белка и гликозилирования. Оба эти процесса стимулируются, например, добавлением митогена или сыворотки. Каким же образом такая клетка, как лимфоцит, может после стимуляции резко усилить гликозилирование до того высокого уровня, который наблюдается при биосинтезе иммуноглобулинов? Не напоминает ли это мобилизацию гормонов чувствительными клетками (например, клетками щитовидной железы) своего метаболизма для образования специфического конечного гликопротеина (например, тиреоглобулина)? Существуют несколько возможных путей. Не исключено, что концентрации гликозилирующих ферментов и активных сахарных промежуточных метаболитов в условиях покоя в клетках являются насыщенными. Тогда гликозилирование нарастающего числа вновь синтезируемых полипептидов должно быть согласовано. Однако имеющиеся данные наводят на мысль, что реакции гликозилирования регулируются внутриклеточной концентрацией долихола и долихолфосфата. Синтез долихолфосфата является частью общего пути биосинтеза холестерина и убихинона (рис. 3.15), а фермент гидрокси-3-метилглутарил-СоА-редуктаза, катализиру-

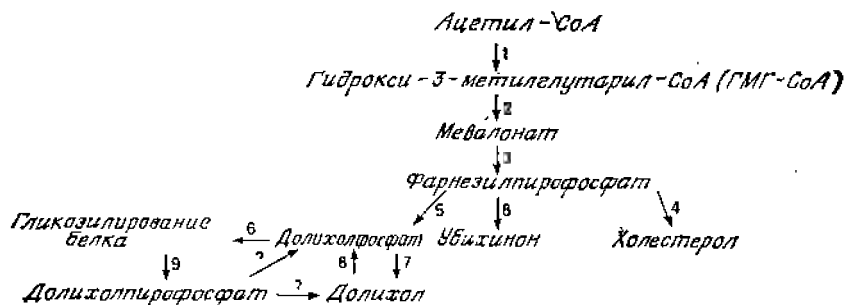


Рис. 3.15. Биосинтез холестерина и долихола. СоА — кофермент А.

шая образование мевалоновой кислоты (рис. 3.15, стадия 2), служит важным регуляторным пунктом при биосинтезе обоих соединений. Ингибитор этого фермента 25-гидроксихолестерол уменьшает синтез холестерина и долихолфосфата и снижает уровень гликозилирования белков, по крайней мере у некоторых клеток [50]. Подобное же ингибирование вызывает *компактин* — эффективный ингибитор гидрокси-3-метилглутарил-СоА — редуктазы из *Penicillium citrinum* [51]. Интересно, что добавление компактина к развивающимся эмбрионам морских ежей блокирует специфическую гастрюляцию, а добавление экзогенного долихола возвращает это развитие к норме, возможно, путем непосредственного влияния на гликозилирование. В печени избыток холестерина угнетает синтез гидрокси-3-метилглутарил-СоА — редуктазы, но этот фермент не может быть первым этапом регуляции синтеза холестерина в печени, поскольку превращение фарнезилпирофосфата в холестерол при этом тоже подавляется (рис. 3.15, стадия 4). По этой причине происходит увеличенный переход фарнезилпирофосфата в долихолфосфат (стадия 5) и убихинон (стадия 8) и стимулируется гликозилирование белка [52]. В печени при нормальных условиях переход предшественников в долихолфосфаты составляет всего лишь 1/100 их превращения в холестерол. Поэтому, даже когда гидрокси-3-метилглутарил-СоА — редуктаза частично ингибирована, все-таки образуется достаточное количество фарнезилфосфата, чтобы обеспечить превращение в долихолфосфат.

Все эти результаты в совокупности свидетельствуют о наличии важного метаболического контроля гликозилирования белков на уровне образования долихолфосфата. Поскольку количество долихолфосфата лимитирует скорость гликозилирования, возможно, существует дополнительный контроль превращения долихолпирофосфата (рис. 3.15, стадия 9) в долихолфосфат специфическими фосфатазами и СТР-зависимой киназой, действующими независимо на отдельные пулы свободных долихол или эфиров долихола.

3.6.2. Генетический контроль

Генетический контроль биосинтеза гликопротеинов оказывается возможным в силу двух обстоятельств. Во-первых, он может осуществляться при трансляции генов хорошо известным матричным механизмом, приводящим к образованию полипептидов, имеющих подходящую аминокислотную последовательность (а возможно, и конформацию) вокруг определенных аминокислотных остатков, узнаваемых при гликозилировании. Во-вторых, ему способствует наличие в клетке сложных ферментных систем, обуславливающих как синтез активированных сахаров, предназначенных для переноса таких сахаров на акцепторы, так и процессинг.

Как мы уже видели, для сборки гликанов требуется наличие мультиферментных комплексов: в процессе построения олигосахаридной последовательности продукт реакции становится субстратом для отдельного фермента или нескольких ферментов, действующих конкурентно. Это метаболическое взаимодействие ферментных систем приводит к разнообразию углеводных структур в гликопротеинах. Конечно, эти ферменты сами по себе являются прямыми продуктами генов, и само собой разумеется, что их синтез служит одной из форм генетического контроля. Прямое доказательство такого контроля можно получить в опытах с мутантными линиями клеток, которые будут описаны позже. Однако основные принципы лучше всего проиллюстрировать, рассмотрев генетический контроль биосинтеза (рис. 3.16) основного комплекса антигенов специфичности группы крови АВО(Н) [53].

А- и В-детерминанты, уникальные тетрасахаридные структуры которых обнаруживаются с помощью антител и которые могут быть присоединены к различного типа носителям, синтезируются, конечно, специфическими гликозилтрансферазами. Присутствие последних в клетке определяется генотипом данной особи. Необходимая предварительная стадия в сборке А- и В-детерминант заключается в присоединении остатка фукозы к предпоследнему остатку галактозы в предшественнике. Этот фермент присутствует у всех индивидуумов, за редким исключением носителей генотипа Bombay, который уже

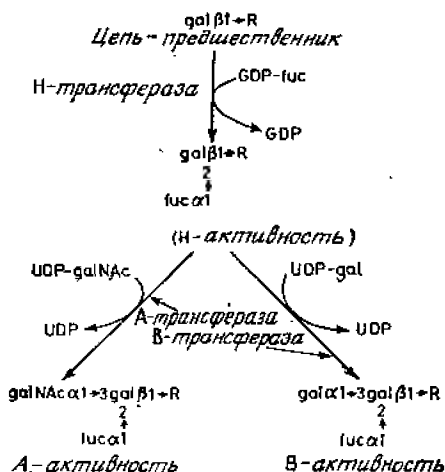


Рис. 3.16. Биохимические пути сборки А-, В- и Н-структур. R — 3 (или 4) glcNAc , связанный с олигосахаридами различных структур, которые, насколько известно, не входят в состав антигенических группоспецифических детерминант системы ABO(H).

обсуждался выше. Этот антиген образуется присоединением фукозы и определяется серологически как Н-детерминанта. Он является продуктом фермента, детерминруемого геном *H*. Редкий ген *h* у индивидуумов группы Bombay либо вовсе не кодирует активного фермента, либо активность фермента настолько мала, что последующая модификация олигосахарида эффективно блокируется в условиях нормального биосинтеза. Продукт, образованный благодаря активности Н-трансферазы, затем распознается ферментами, кодируемыми генами *A* и *B*. Трансфераза, контролируемая геном *A*, — это UDP-N-ацетилгалактозамин: O- α -L-фукозил-(1 $\rightarrow$ 2)-D-галактоза — α -3-N-ацетилгалактозаминилтрансфераза. Индивидуумы с генотипом *A* образуют данную трансферазу, и, следовательно, у них происходит и синтез сложных углеводных последовательностей, оканчивающихся такими последовательностями. Индивидуумы с генотипом *B* в отличие от этого образуют фермент UDP-галактоза: O- α -L-фукозил-(1 $\rightarrow$ 2)-D-галактоза — α -3-галактозилтранс-

фераза, кодируемый геном *B*. Индивидуумы группы *Вom-Bau* несут функционирующие гены *A* и *B*, образующие активные *A*- или *B*-ферменты, но не способны образовывать *A*- и *B*-антигены, так как необходимая первая стадия у них отсутствует из-за того, что у них неактивен либо сам ген *H*, либо продукт этого гена. Индивидуумы, несущие как *A*-, так и *B*-гены, образуют *A*- и *B*-трансферазы и синтезируют углеводные цепи, оканчивающиеся последовательностями, распознаваемыми как *A*- и *B*-детерминанты (рис. 3.16).

Судя по всему, гены *A* и *B* являются аллельными генами. Это весьма необычно, так как они кодируют ферменты с качественно различной специфичностью, тогда как обычно продукты аллельных генов различаются по своему биохимическому действию только количественно. Предполагается, что третий аллельный ген *ABO*-систем — молчащий в том смысле, что он не вызывает различий в действии гликозилтрансфераз, действующих на продукт гена *H*. У людей с группой крови *O* *H*-активная структура далее не модифицируется в серологически распознаваемую форму.

3.6.3. Модуляторы гликозилтрансфераз

Другой тип контроля реакций гликозилирования можно проиллюстрировать на примере галактозилтрансферазы, отвечающей за синтез лактозы (рис. 3.3). В молочных железах такой активностью обладает комплекс каталитической субъединицы гликопротеина с молекулярной массой 50 000 и α -лактальбумина с молекулярной массой 14 000. Эти субъединицы образуют в соотношении 1:1 молекулярный комплекс, катализирующий перенос галактозы с UDP-галактозы на глюкозу (рис. 3.3, *B*). Однако в тканях, не образующих лактозы, имеется только каталитическая субъединица. В этом случае она уже переносит галактозу от UDP-галактозы на концевые остатки *N*-ацетилглюкозамина в гликопротеинах или на свободный *N*-ацетилглюкозамин, образуя последовательность $\text{gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{glcNAc}$, присутствующую во многих *N*-гликанах. Модуляторная субъединица α -лактальбумин способствует связыванию глюкозы с галакто-

зилтрансферазой через ряд синергических равновесий так, что значение K_m снижается с 2 М до 2мМ или ниже. Поскольку ткань молочной железы — единственная ткань, содержащая α -лактальбумин, синтез лактозы катализируется при физиологических концентрациях глюкозы. Таким образом, α -лактальбумин является некаталитическим модулятором галактозилтрансфераз.

Было бы чрезвычайно интересно узнать, существуют ли другие примеры такого типа генетической регуляции активности ферментов, например гликозилтрансфераз, способных присоединять один и тот же моносахарид к чрезвычайно похожим субстратам.

4. Функции

4.1. Процессинг полипептидов

Многие полипептиды и белки синтезируются в виде гигантских предшественников, которые затем расщепляются специфическими протеазами с образованием «зрелых», биологически активных продуктов. Весьма важную роль в регуляции подобного фрагментирования, вероятно, могут играть гликаны. Это объемные компоненты гликозилированных полипептидов, способные регулировать расщепление определенных участков цепи, что весьма существенно для получения активных компонентов. Ниже мы рассмотрим один соответствующий пример.

В гипофизе образуется очень большой набор биологически активных пептидов, в том числе аденокортикотропин, меланотропин и эндорфины. Каким именно путем может появиться столь большое число соединений, стало ясно после идентификации единого их предшественника, выделения мРНК из средней доли гипофиза и клонирования генов. Наличие комплементарной ДНК (кДНК) с известной первичной структурой позволило установить последовательность расположения участков, кодирующих каждый из активных полипептидов. По обеим сторонам этих участков находятся пары основных аминокислот, которые могут служить сигналом для высокоспецифических гипофизарных пептидаз, подобных по своей активности трипсину. В передней доле гипофиза фрагментация останавливается на стадии N-концевого фрагмента, в состав которого входят N-гликаны, кортикотропин и β -липотропин. В средней доле последние два фрагмента очень быстро расщепляются на β -эндорфин и α -меланотропин. После обработки туникомидином, блокирующим гликозилирование, клетки образуют лишь очень мало биологически активных пептидов. Это свидетельствует о том, что N-гликаны способны как-то контролировать доступность участков, которые подвергаются протеолизу. Лишь в полностью гликозилированных предшественниках имеются боковые участки, богатые основными аминокислотами и способные к предпочтительному расщеплению гипофизарными ферментами, что приводит

к серии реакций, обеспечивающих образование биологически активных фрагментов [54].

4.2. Лектины: белки, связывающие углеводы

4.2.1. Общие свойства

Термином «лектин» обозначают белок неиммунного происхождения, способный преципитировать гликопротеины и вызывать агглютинацию клеток, причем эта активность подавляется углеводами. Такое определение предполагает наличие множественной валентности: белок должен иметь по крайней мере два участка, связывающих углеводов, с тем чтобы образовывать поперечные связи разными молекулами гликопротеинов. Первые изученные лектины были выделены из растений. Пауль Эрлих (Ehrlich) [1] использовал в своих работах лектин из касторовых бобов *Ricinus communis*. Результаты проведенного им изучения активности этого лектина рассматриваются ниже. Самнер (Sumner) в 1919 г. получил в кристаллическом виде другой лектин — конканавалин А — из мечевидной канавалии *Canavalia ensiformis*. Этот лектин изучен лучше всего. Краткая характеристика строения и свойств растительных лектинов приведена в табл. 4.1 [55]. В последнее время лектины были выде-

Таблица 4.1. Свойства некоторых очищенных лектинов

Источник	Обычное название	Сокращенное название	Молекулярная масса	Специфичность
<i>Arachis hypogaea</i>	Арахис	PNA	110 000	gal
<i>Canavalia ensiformis</i>	Канавалия	Con A	102 000	man
<i>Ricinus communis</i>	Касторовые бобы	RCA I	120 000	gal, galNAc
<i>Ricinus communis</i>	То же	RCA II (рицин)	60 000	gal NAc, gal
<i>Triticum vulgare</i>	Проростки зерен пшеницы	WGA	36 000	Сигаловые кислоты (glc NAc) ₂

лены также из тканей животных; исследования в этом направлении сыграли исключительно важную роль в изучении функциональной роли макромолекул, содержащих углеводы.

Каковы биологические функции лектинов в растениях, до сих пор не ясно. Из высказанных по этому поводу предположений следует упомянуть следующие. Во-первых, лектины могут играть роль, аналогичную иммунной системе иммунокомпетентных организмов, т. е. фиксировать патогенные микробы и способствовать их разрушению. Во-вторых, имеются веские доводы в пользу того, что лектины у бобовых растений способствуют заселению корней растений азотфиксирующими микроорганизмами, например такими, как *Rhizobia*. Вполне возможно, что лектины участвуют также в других процессах, например в прорастании, причем не исключено даже, что это их самая важная функция. Вне зависимости от роли, которую играют лектины растений, они служат очень удобным инструментом для изучения таких вопросов, как функции гликопротеинов в клетках и специфичность взаимодействия углеводов с белками. Такие углевод-белковые взаимодействия имеют важное биологическое значение для целого ряда хорошо изученных систем, описанных в последующих разделах. Очищенные лектины из растений — весьма удобная модель для изучения таких взаимодействий.

4.2.2. Специфичность

В табл. 4.1 приведена специфичность лектинов в отношении сахаров. Эти данные были получены в опытах по подавлению простыми углеводами агглютинации клеток, вызываемой лектинами. Обычно отдельный моносахарид, метилгликозид (α или β) или дисахарид (например, $\text{gal}\beta 1 \rightarrow 3\text{galNAc}$ в случае лектина из арахиса), будучи добавлены в миллимолярных концентрациях, ингибируют активность лектина. Однако специфичность лектинов значительно выше, чем выявляется в подобных опытах, поскольку они часто способны различать достаточно длинные углеводные цепи — аналогично эндогликозидазам (гл. 2) и гликозилтрансферазам, а также фер-

менту из бактерий — лизоциму. Последний способен гидролизовать хитин и олигомеры N-ацетилглюкозамина, соединенные ($\beta 1 \rightarrow 4$)-связью. Для наибольшего соответствия субстрата активному центру лизоцима требуется наличие шести моносакхаридных остатков. Лизоцим связывает и меньшие по размерам олигомеры, но с более низким сродством. Длинные цепи связываются не лучше, чем олигосахариды, состоящие из шести остатков. Сходной специфичностью обладает лектин из проростков пшеницы (табл. 4.1). Для этого лектина оптимальным рецептором является трисахарид из остатков N-ацетилглюкозамина, связанных гликозидной ($\beta 1 \rightarrow 4$)-связью. N-ацетилнейраминная кислота также связывается лектином, но с меньшим сродством, чем вещества типа хитобиозы.

Подобно этому, конканавалин А реагирует лучше с цепями, содержащими маннозу, чем просто с остатком маннозы или маннозидами. Согласно данным рентгеноструктурного анализа, каждая из четырех идентичных субъединиц лектина имеет по одному участку, связывающему углевод, причем он соответствует одному-двум моносакhariдам. Условия, минимально необходимые для связывания, — это наличие D-манно- или D-глюкопиранозидной конфигурации при C-3, C-4 и C-6, причем предпочтительным для связывания служит α -аномер. Таким образом, несмотря на небольшие размеры участка связывания, способность к распознаванию разных углеводных последовательностей гликопротеинов может быть очень значительной. Наиболее важным сахаром, участвующим в связывании гликопротеинов с конканавалином А, являются остатки α -маннозы, поскольку глюкоза обычно редко встречается в гликопротеинах, как и концевые N-ацетилглюкозамины. Значительная часть остатков α -маннозы занимает концевое положение у олигоманнозидных гликанов. С другой стороны, связываться способны и неконцевые остатки маннозы, замещенные по C-2 гликозидной связью. Основное требование для хорошего связывания — это наличие двух остатков α -маннозы, присоединенных к другому остатку с образованием разветвленной структуры (рис. 4.1). Этим последним может быть α -манноза, связанная с коровой

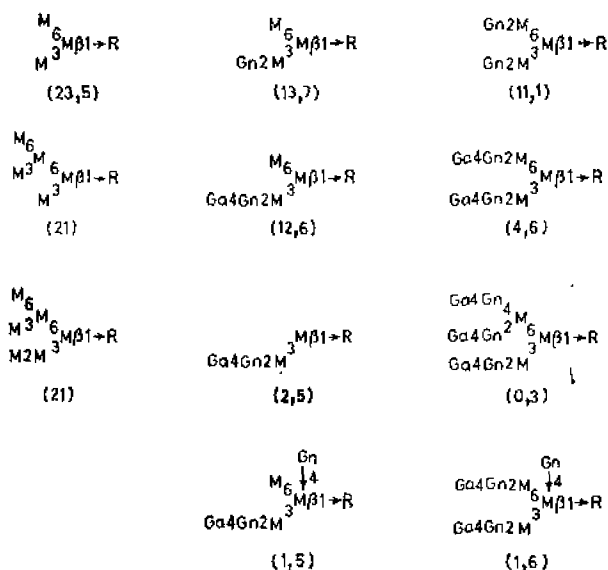


Рис. 4.1. Специфичность связывания у конканавалина А. Числа в скобках — значения констант ассоциации ($\times 10^6 \text{ M}^{-1}$) [56]. R — $\text{glcNAc}\beta 1 \rightarrow \text{glcNAcAsp}$.

областью, или man_5 - и man_6 -производные, как, например, у овальбумина, причем хорошее связывание сохраняется даже после удлинения цепи другими остатками N-ацетилглюкозамина, галактозы и сиаловой кислоты. Однако сродство связывания резко снижается при замещении по C-4 одного из α -маннозных остатков. Более удивительным является тот факт, что замещение N-ацетилглюкозаминном остатка α -маннозы в коровой области «гибридных» N-гликанов также снижает способность связывания с внешними разветвленными α -маннозильными звеньями. Возможно, что в этом случае остаток N-ацетилглюкозамина мешает взаимодействию с конканавалином А, заслоняя α -маннозильные остатки, либо вызывает такое конформационное изменение (растягивание) α -маннозильных остатков, которое неблагоприятно для многовалентного связывания с лектином.

Часто очистку гликопротеинов и гликопептидов проводят с помощью метода аффинной хроматографии на конканавалине А, присоединенном к сефарозе или агарозе. На колонках с этими сорбентами задерживаются только молекулы, имеющие участки связывания углеводов с константой ассоциации выше $4 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$. Это позволяет достаточно просто разделить гликаны, имеющие очень близкую структуру.

Лектины соевых бобов RCA I и RCA II (рицин) — очень сходные белки, построенные из нескольких субъединиц (рис. 4.2). Первый из них способен агглютини-

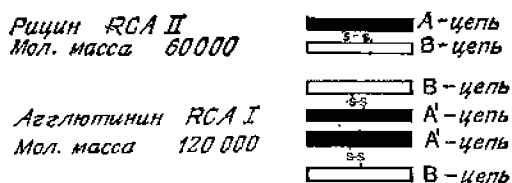


Рис. 4.2. Строение лектинов касторовых бобов.

Sa6Ga4Gn2M ₆ 3Mβ1→R		Ga4Gn2M ₆ 3Mβ1→R	Ga4Gn ₄ Ga4Gn2M ₆ 3Mβ1→R
Sa6Ga4Gn2M ₆ 3Mβ1→R		Sa6Ga4Gn2M ₆ 3Mβ1→R	Ga4Gn2M ₆ 3Mβ1→R
RCA I 7,6	15	15	
RCA II 2,1	8,4	14,4	
Gn2M ₆ 3Mβ1→R		Gn2M ₆ 3Mβ1→R	Gn4 Gn2M ₆ 3Mβ1→R
Sa6Ga4Gn2M ₆ 3Mβ1→R		Gn2M ₆ 3Mβ1→R	Gn2M ₆ 3Mβ1→R
RCA I 3,4	0	0	
RCA II 1,4	0	0	
Sa3Ga3Ganα1→R ₂		Ga3Ganα1→R ₂	Ganα1→R ₂
RCA I 0	2,7	0	
RCA II 0	7,7	0,7	

Рис. 4.3. Специфичность связывания у лектинов касторовых бобов RCA I и RCA II (рицин). Приведены величины константы ассоциации ($\times 10^6 \text{ M}^{-1}$) [58]. R — $\text{glcNAc}\beta 1 \rightarrow 4\text{glcNAcAsp}$. R₂ — полипептид.

ровать клетки при низких концентрациях; его молекулярная масса равна 120 000. Молекула RCA I состоит из двух В-цепей, имеющих участки связывания углеводов и двух А'-цепей. Риксин агглютинирует клетки только при высоких концентрациях и имеет лишь одну В-цепь и одну А-цепь, которая сходна с А'-цепью, но не идентична ей. Полипептидные цепи двух этих лектинов очень схожи между собой по своему аминокислотному и углеводному составу (у В-субъединицы имеется олигосахарид с высоким содержанием маннозы), а также по N-концевой аминокислотной последовательности. У риксина, однако, А-субъединица отличается очень высокой токсичностью [57]; причины токсичности будут описаны ниже. По специфичности связывания RCA I и риксин значительно отличаются друг от друга (рис. 4.3). RCA I, как правило, связываются со сложными N-гликанами с большим сродством, чем с О-гликанами [58], а N-гликаны, имеющие два концевых остатка галактозы, лучше реагируют с лектином, чем гликаны, содержащие галактозу лишь на одном конце цепи. В отличие от конканавалина А риксин и RCA I хорошо связываются с N-гликанами, у которых остатки α -маннозы при C-2 и C-4 присоединены к цепи, содержащей галактозу. Сигнализация N-гликанов не оказывает заметного влияния на их связывание с лектином, однако О-гликаны после этого полностью теряют свою реакционную способность. Присоединение лектинов к олигосахаридам $\text{gal}\beta 1 \rightarrow 3\text{galNAc}\alpha 1 \rightarrow \text{Ser (Thr)}$ или $\text{galNAc}\alpha 1 \rightarrow \text{Ser (Thr)}$ резко возрастает, если вдоль полипептидной цепи разбросано много моно- или дисахаридов, как, например, в случае десигналированного гликофорина.

4.2.3. Токсические лектины

Риксин является одним из наиболее токсических веществ, и даже очень небольшие его дозы способны убить человека. В 1979 г. на одной из улиц Лондона был застрелен — вероятно, по причинам политического характера — диктор болгарского радио Георг Марков. В теле убитого была обнаружена полая пуля. Судя по ее размерам, существует только два яда, которые могли уме-

ститься в ней в количестве, достаточном, чтобы убить человека. Одним из них был рицин. И действительно, он был обнаружен при посмертном обследовании убитого.

Менее мрачная сторона дела состоит в том, что рицин служит очень ценным инструментом для изучения функций гликопротеинов и, в частности, для выяснения механизма, с помощью которого клетки поглощают такие небольшие белки, как гормоны. Рицин связывается с углеводами поверхности клетки своей В-субъединицей (рис. 4.4). Клеточные рецепторы, как уже говорилось, представляют собой углеводные цепи, содержащие галактозу. Затем рицин проникает в цитоплазму, где он диссоциирует на субъединицы. А-субъединица, связываясь с рибосомами, блокирует синтез белка. Для полного прекращения синтеза белка в цитоплазме необходимо присутствие лишь небольшого числа молекул рицина. При этом, видимо, происходит каталитическая инактивация рибосомного фактора (или факторов) А-субъединицей. Известно также еще несколько других токсинов со сходным механизмом действия. Все эти токсины состоят из двух разных субъединиц. Одна из них способна связываться с рецепторами клеточной поверхности, а другая, оказывая влияние на тот или иной жизненно важный обменный процесс, убивает чувствительную клетку. Токсический лектин абрин (из семян *Abrus precatorius*) связывается с теми же участками, что и рицин, и ингибирует синтез белка, а модецин — лектин из *Adenia digitata* — также связывается с галактозными рецепторами. Одна из двух субъединиц дифтерийного токсина специфически реагирует с гликопротеинами, а другая, ток-



Рис. 4.4. Механизм действия рицина.

сическая, тормозит синтез белка, влияя на процесс переноса ADP-рибозильной группы от NAD^+ к фактору элонгации 2 (EF2). Место приложения токсического действия других лектинов точно еще не установлено, однако известно, что во всех случаях связывание с углеводными рецепторами является необходимым первым этапом и что одним из факторов цитотоксичности служит подавление транспорта питательных веществ через мембрану.

4.2.4. Клетки, резистентные к лектину

Относительно трудно выделить клетки, не чувствительные к цитотоксическому действию лектинов, например рицину, из мутировавших или немутировавших клеточных популяций. Резистентные клеточные линии, которые очень стабильны, подразделяются на две основные группы: клетки, неспособные связывать лектин своей поверхностью, и клетки, неспособные пропустить внутрь токсин, уже связанный на поверхности. Клетки первой группы мутантов особенно удобны для изучения функций углеводов клеточной поверхности [59].

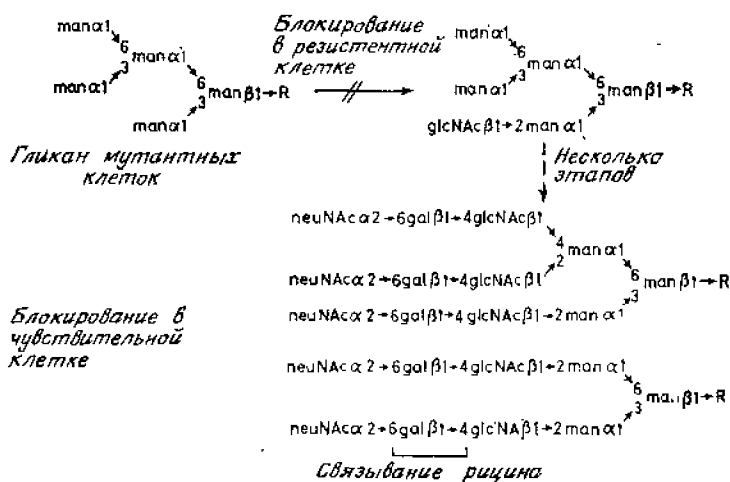


Рис. 4.5. Блокирование ферментов в клетках, резистентных к рицину. R — $\text{glcNAc}\beta 1 \rightarrow 4 \text{ glcNAcAsp}$.

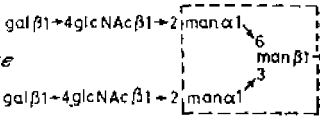
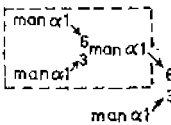
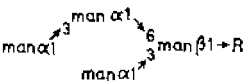
Клетки	Строение углеводов	Конканавалин	
		Связывание	Резистентность
Родительские		+	-
Дефектные по glcNAc-трансферазе		+++	-
Резистентные к Кона		-	+

Рис. 4.6. Строение углеводов у клеток, резистентных к конканавалину А. Пунктиром обведены звенья, связывающиеся с конканавалином А. R — $\text{glcNAc}\beta 1 \rightarrow 4\text{glcNAcAsp}$.

Обычно у мутантных клеток, резистентных к рицину, отсутствует фермент N-ацетилглюкозаминилтрансфераза I (гл. 3). Экстракты таких клеток не способны переносить N-ацетилглюкозамин от UDP-N-ацетилглюкозамина к соответствующему акцептору, например к гликопептиду V овальбумина. Поэтому в таких клетках уже на ранней стадии блокируется сборка N-гликана и образуются углеводные цепи, лишенные участков, содержащих галактозу, что необходимо для связывания рицина поверхностью клетки (рис. 4.5). Однако углеводные цепи мутантных клеток служат прекрасными рецепторами для конканавалина А, и поэтому такие клетки более чувствительны к слабому цитотоксическому действию этого лектина.

У клеток, резистентных к конканавалину А, обнаружено необычное нарушение процесса сборки N-гликанов (рис. 4.6). Из мутантов, дефектных по glcNAc -трансферазе I, можно отобрать двойные мутанты, резистентные к конканавалину А. Такие двойные мутанты плохо связывают конканавалин А, так как у них произошла потеря одного остатка α -маннозы (рис. 4.6), необходимого

для связывания (рис. 4.1). Возможно, этот дефект объясняется недостаточностью $\alpha 1 \rightarrow 6$ -маннозилтрансферазы, участвующей в сборке олигосахарид-липидного промежуточного продукта. В результате происходит накопление углевода (man)₇, который гликозилируется, переносится на белок и в отсутствие glcNAc-трансферазы I превращается в углевод, показанный на рис. 4.6 [60]. Другой тип мутации, обуславливающий резистентность к конканавалину А, уже упоминался. Сниженная способность к связыванию этого лектина характерна и для клеток, не способных к образованию долихилманнозилофосфата [27, 61]. Очевидно, что у гликопротеинов таких мутантов меньше олигоманнозидных цепей, способных эффективно реагировать с конканавалином А.

4.3. Внутриклеточный транспорт гликопротеинов

4.3.1. Блокирование гликозилирования

Как указывалось в разд. 3.5, гликозилирование осуществляется уже на ранних этапах перемещения многих белков, синтезированных в цистернах шероховатого ретикулума, либо к месту их окончательной локализации, либо к месту выхода из клетки в процессе секреции. Вначале предполагалось, что гликозилирование белков может способствовать их секреции. Позднее на основе этой гипотезы была построена новая гипотеза, предполагавшая, что гликозилирование необходимо для проникновения белков в мембраны и их транспортирования мембранами к другим внутриклеточным мембранам, а также к клеточной поверхности. Однако экспериментальные данные в пользу такой модели оказались противоречивыми. Многие белки вовсе не нуждаются в гликозилировании для внутриклеточного переноса от места сборки полипептидной цепи до места окончательного расположения. Это было показано с помощью ингибиторов, например туникамицина, а также при изучении клеточных мутантов, у которых гликозилирование не происходит.

Линии клеток лимфомы, резистентных к конканавалину А и дефектных по синтезу долихилманнозилофосфата,

представляют собой очень интересный пример того избирательного действия, которое может быть вызвано блокированием гликозилирования. На поверхности этих клеток не образуется главный гликопротеиновый антиген, обозначаемый как Thy-1, хотя другие гликопротеиновые антигены можно обнаружить на клеточной поверхности в обычном количестве [62]. Вполне возможно, что некоторые белки, будучи негликозилируемыми или лишь частично гликозилированными, проявляют особенно высокую чувствительность к внутриклеточному протеолизу, тогда как другие к нему относительно резистентны и в ходе внутриклеточного транспорта остаются более или менее неповрежденными. У клеток, обработанных туникамицином, обычно наблюдается очень набухший эндоплазматический ретикулум, буквально наполненный негликозилированными белками, которые в обычных условиях переходят в другие участки клетки. Очень ярким примером подобного дефекта служит патологическое состояние у людей, известное как недостаточность α_1 -антитрипсина. В печени таких больных образуется белок ингибитор протеазы, сходный с таковым у здоровых людей, у которых он секретируется в кровь. Однако в патологической печени N-гликаны ингибитора представляют собой, видимо, нестроенные олигоманнозидные цепи, тогда как в норме у секретируемого белка углеводный компонент является сложным гликаном, содержащим также сиаловую кислоту [63]. Разумеется, трудно решить, действительно ли нормальный внутриклеточный транспорт блокирован из-за дефекта в сборке N-гликана, или же недостаточное гликозилирование просто отражает ту стадию процесса, на котором внутриклеточный транспорт остановился вследствие каких-то иных причин.

4.3.2. Цикл лизосомных ферментов

Данные, непосредственно свидетельствующие о важной роли нормального процесса гликозилирования, были получены за последние пять лет при изучении внутриклеточного цикла группы гидролаз, присутствующих в лизосомах. В ходе этих исследований была обнаружена особая система, имеющая общее значение, и, кроме

того, вскрывающая биохимический дефект, лежащий в основе одного патологического состояния у человека.

Это редкое заболевание называется I-клеточной болезнью. (Не следует путать с II-антигенами; это не очень удачная номенклатура, но она широко используется в литературе и ее не так просто изменить.) Лица, страдающие I-клеточной болезнью, погибают в раннем возрасте, причем у них обнаруживаются в клетках большие скопления высокомолекулярных гликоконъюгатов. Основная причина этой болезни — нарушение нормального содержания внутриклеточных лизосомных гидролаз, обуславливающих расщепление поглощенных компонентов соединительной ткани. Аналогичный дефект наблюдается при культивировании клеток (например, фибробластов кожи), взятых у таких больных: культивируемые клетки секретируют в среду аномально большое количество лизосомных гидролаз. Иными словами, эти клетки секретируют гидролазы, которые в нормальных условиях находятся внутри лизосомных пузырьков и разрушают поглощенные макромолекулы и остатки клеток [64]. На поверхности нормальных и I-клеток имеется рецептор, распознающий определенные структурные признаки лизосомных гидролаз и вызывающий адсорбционный эндоцитоз этих ферментов. I-клетки способны опосредовать поглощение гидролаз из нормальных клеток, но не могут распознать ферменты, образованные и секретируемые ими самими. Более того, нормальные клетки также не могут распознать гидролазы, синтезированные I-клетками; очевидно, поэтому, что наблюдаемый дефект связан со строением самих гидролаз I-клеток, а не с блокированием адсорбционного эндоцитоза или рецепторной функции клеток. Впервые важная роль углеводного компонента лизосомных гидролаз была установлена, когда обнаружилось, что 1) маннозо-6-фосфат конкурентно подавляет поглощение нормальных гидролаз нормальными фибробластами, 2) у различных лизосомных ферментов имеются фосфорилированные N-гликаны и 3) обработка фосфатазами приводит к тому, что поглощение гидролаз снижается. У ферментов, секретируемых I-клетками, такой углеводный компонент отсутствует, и они не связываются поверхностью ни нормальных, ни

некоторые из остатков маннозы фосфорилируются предпочтительнее (рис. 4.8, ++++), а другие вообще не фосфорилируются. Во многих случаях у одного N-гликана могут быть две фосфорилированные маннозы, а данный определенный фермент (например, β -глюкуроксидаза) может иметь целый набор разновидностей гликанов. Причины такой гетерогенности до сих пор не установлены [65]. Маннозо-6-фосфатные звенья узнаются специфическими рецепторами, локализованными на стороне цистерн тех участков элементов эндоплазматического ретикулума и аппарата Гольджи, которые в конце концов отпочковываются в первичные лизосомы, содержащие полный набор гидролитических ферментов на внутренней стороне лизосомной мембраны. Для лизосом характерны низкие значения pH, что, вероятно, обусловлено очень большой концентрацией гликопротеинов, содержащих сиаловую кислоту и обращенных внутрь пузырьков. Вследствие такого pH ослабляется связь между маннозо-6-фосфатными группами и специфическими рецепторами, и гидролазы оказываются более или менее свободно распределенными в лизосомной жидкости. Гликаны этой стадии дефосфорилируются для удаления сигнала узнавания [66]. Макромолекулы и клеточные остатки, попадающие в клетки в результате адсорбционного эндоцитоза в виде эндоцитотических пузырьков, сливаются затем с первичными лизосомами и быстро разрушаются под действием всего набора лизосомных ферментов (при оптимальном для них значении pH 4,5). В I-клетках фосфорилирование N-гликанов, по-видимому, блокировано. Поэтому сигналы узнавания отсутствуют, и лизосомные ферменты попадают в секреторные пузырьки, а не в участки эндоплазматического ретикулума и аппарата Гольджи, предназначенные для образования лизосом.

Эксперименты, проведенные в последнее время, показали, однако, видоизменить эту простую схему [67, 68]. Фосфорилирование остатков маннозы лизосомных гидролаз не происходит непосредственно путем переноса фосфатных групп с АТР, например под действием киназ. Вероятно, после частичного процессинга и переноса обычного полисахарида, содержащего глюкозу и маннозу, с липидного предшественника на белок (рис. 4.9)

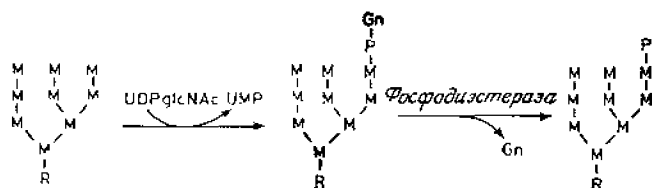


Рис. 4.9. Промежуточные продукты биосинтеза лизосомной β -глюкоронидазы. R — коровая область N-гликанов. Показана только одна фосфорилированная форма. Другие формы показаны на рис. 4.8.

происходит перенос α -N-ацетилглюкозамин-1-фосфата от UDP-N-ацетилглюкозамина на C-6 остатка маннозы. Поскольку эта реакция является высокоизбирательной и происходит только с лизосомными ферментами, она скорее всего осуществляется лишь на поздней стадии дифференцировки эндоплазматического ретикулума и образования предшественника лизосом. Кроме того, может быть, что только ферменты лизосом имеют в «участке узнавания» пекий домен (часть полипептидной цепи), который исключает другие гликопротеины, имеющие гликаны с высоким содержанием маннозы. Возможно также, что соответствующая специфическая трансфераза локализована вблизи от рецепторов маннозо-6-фосфата в специализированных участках эндоплазматического ретикулума на той стороне, где находятся цистерны. На следующем этапе ферментативного процесса под действием высокоспецифической α -N-ацетилглюкозаминил — фосфодиэстеразы образуется маннозо-6-фосфатный «сигнал», под действием которого высвобождается свободный N-ацетилглюкозамин и запускается связывание лизосомных ферментов с рецепторами. Оба описанных выше фермента преимущественно обнаруживаются в очищенном препарате гладких мембран аппарата Гольджи, что хорошо укладывается в основную гипотезу. В полном соответствии с данными о том, что биохимический дефект в I-клетках заключается в неспособности образовывать фосфорилированную форму лизосомных ферментов, специфическая реакция переноса N-ацетилглюкозамин-1-фосфата в этих клетках полностью отсутствует. Ферменты, содержащие остатки маннозо-6-фосфата, широко

распространены, как это можно было предвидеть, исходя из того, что лизосомы — характерный компонент клеток.

4.4. Катаболизм и клиренс

Распад белков в клетке в ходе нормального роста и дифференцировки находится под определенным контролем [69]. Частично деградация и обновление белков определяются свойственными им характерными наследуемыми признаками, например конформацией полипептидной цепи. Имеются, однако, убедительные данные о том, что углеводные компоненты также участвуют в регуляции катаболизма гликопротеинов. Например, в печени гликопротеины плазматических мембран обновляются быстрее, чем негликозилированные белки, а в культивируемых линиях клеток гликопротеины плазматических мембран почти полностью обновляются за несколько часов в условиях, почти полностью предотвращающих рост [18].

Обнаружен сигнал углеводного типа для катаболизма гликопротеинов, который, вероятно, имеет отношение к обсуждаемым процессам. Так, гликопротеины, находящиеся в кровотоке, захватываются печенью, где и происходит их катаболизм.

4.4.1. *Растворимые гликопротеины*

Описываемая ниже система была обнаружена случайно. Гилберт Эшвелл, Анатолий Морелл (Ashwell, Morell) и их сотрудники были намерены проследить судьбу церулоплазмина, введенного в кровоток. Вначале этот гликопротеин обрабатывали нейраминидазой, чтобы обнажить остатки галактозы, имеющиеся в составе N-гликанов (рис. 2.5). Теперь можно было пометить остатки галактозы радиоактивным изотопом, вначале обрабатывая галактозооксидазой для образования альдегидной группы при C-6, а затем проводя восстановление тритированным боргидридом натрия. Неожиданно обнаружилось, что меченый гликопротеин уже за несколько минут исчезал из крови и появлялся в печени крыс, тогда как

необработанный гликопротеин циркулировал в течение нескольких дней. При последующем анализе этого интересного феномена было установлено, что поверхность гепатоцитов обладает лектиноподобной активностью, позволяющей им связывать концевые галактозные остатки различных асиалогликопротеинов и тем самым способствовать попаданию галактопротеинов в лизосомы, где они гидролизуются кислыми гидролазами [70]. Эти данные позволяют также объяснить ранее сделанные наблюдения, согласно которым орозомукоиды крови человека почти полностью салированы, и у них экспонировано лишь очень немного остатков галактозы, если вообще таковые имеются.

Лектин, связывающий галактозу, представляет собой гликопротеин, состоящий из нескольких субъединиц (скорее всего из двух). Он прочно «вмурован» в мембрану гепатоцитов и солибилизируется лишь при обработке детергентами. Молекулярная масса одной субъединицы равна 45 000 и отличается от таковой для других галактозоспецифических лектинов, вероятно участвующих в клеточной адгезии (разд. 4.5.1). Лектин гепатоцитов агглютинирует клетки, обработанные нейрамицидазой, и служит митогеном для лимфоцитов, т. е. стимулирует у покоящихся периферических лимфоцитов синтез ДНК. Оба этих свойства указывают на наличие у одной активной молекулы лектина нескольких связывающих центров. На способности ко множественному взаимодействию с лектином также основываются связывание и захват гликопротеинов гепатоцитами [71]. Гликопротеины или очищенные гликопептиды со многими концевыми остатками галактозы связываются с высоким сродством и быстро поглощаются клеткой. Однако гликопротеины со сложными гликанами, содержащими только два концевых остатка, связываются слабо и не вызывают эндоцитоза (рис. 4.10). Например, асиалоорозомукоид с четырехантенными N-гликанами (рис. 2.11) служит очень хорошим субстратом для гепатотического эндоцитоза, тогда как сывороточный асialотрансферрин, имеющий лишь две антенны, наоборот, очень плохо подвергается эндоцитозу [72]. Следует, однако, отметить очень высокое сродство связывания и способность к эндоцитозу

		Сродство связывания	Степень эндоцитоза
<i>А</i>	<i>Асиалоорозомукоид</i> $\begin{array}{c} \text{Ga}-\text{Gn} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{M} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{Ga}-\text{Gn} \quad \text{M}-(\text{Gn})_2-\text{R} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{M} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{Ga}-\text{Gn} \end{array}$	<i>Высокая</i>	<i>Высокая</i>
<i>Б</i>	$\begin{array}{c} \text{Ga}-\text{Gn} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{M} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{Ga}-\text{Gn} \quad \text{M}-(\text{Gn})_2-\text{R} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{M} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{Ga}-\text{Gn} \end{array}$	<i>Высокая</i>	<i>Высокая</i>
<i>В</i>	$\begin{array}{c} \text{Gn}-\text{Gn}-\text{M} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{M}-(\text{Gn})_2-\text{R} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{Ga}-\text{Gn}-\text{M} \end{array}$	<i>Низкая</i>	<i>Низкая</i>
<i>Г</i>	$\begin{array}{c} (\text{Ga})_{\text{Gnuc1}} \\ \\ \text{GalN} \\ \\ \text{Ser, Pro, Pro, Gly, Asp, Asp, Thr,} \end{array} \quad \begin{array}{c} (\text{Ga})_{\text{Gnuc1}} \\ \\ \text{GalN} \\ \\ \text{Ser, Thr, Pro, Pro, Thr, Pro, Ser, Pro, Ser} \end{array}$	<i>Низкая</i>	<i>Низкая</i>
<i>Д</i>	$\begin{array}{c} (\text{Ga})_{\text{Gnuc1}} \\ \\ \text{GalN} \\ \\ \text{Ser, Thr, Pro, Pro, Thr, Pro, Ser, Pro, Ser} \end{array}$	<i>Высокая</i>	<i>Высокая</i>

Рис. 4.10. Связывание и эндоцитоз гликопротеинов гепатоцитами. О-гликаны, содержащие концевые остатки галактозы, ведут себя так же, как и гликопептиды, у которых удалена галактоза. R — остатки аспарагина.

у О-гликанов, содержащих остатки N-ацетилгалактозамина (рис. 4.10).

Подобно тому как для хорошего связывания и запуска эндоцитоза N-гликанами требуется множество близко расположенных антенн, на концах которых находятся остатки галактозы, О-гликаны должны иметь близко расположенные антенны, в состав которых входят остатки N-ацетилгалактозамина. К тому же для связывания с рецепторами не требуется, чтобы концевые остатки N-ацетилгалактозамина были замещены остатками галактозы.

Высокое сродство некоторых гликопротеинов к гепатоцитам можно использовать для удаления белков из кровотока в печень. Например, гликолипид *Б* (рис. 4.10), присоединенный к альбумину, вызывает быстрый клиренс этого белка, в норме негликозилированного и стабильного [70].

Для связывания гликопротеинов с гепатоцитами необходимо присутствие ионов Ca^{2+} , причем данный процесс полностью ингибируется обработкой гепатоцитов или очищенного лектина пептирамидазой. Это происходит потому, что удаление сиаловой кислоты у гликановых цепей лектина вызывает самоагрегацию рецепторов, обусловленную взаимодействием обнажившихся галактозильных концевых остатков.

Присутствие лектина, видимо, ограничивается печенью, где он расположен на поверхности гепатоцитов в прямом контакте с током крови. Такая специфическая локализация указывает на важную роль лектина в удалении частично деградированных или модифицированных гликопротеинов из крови, а возможно, и на участие во внутриклеточном переносе в кровоток сывороточных гликопротеинов, образуемых в печени.

Прямые доказательства участия лектинов гепатоцитов в клиренсе *in vivo* были получены следующим образом. Было показано, что одновременное введение асиалопротеинов в кровь вместе с антителами против очищенного рецептора значительно увеличивает время нахождения этих гликопротеинов в кровотоке [73]. Далее было установлено, что в крови больных циррозом печени имеется больше, чем в норме, гликопротеинов с концевыми остатками галактозы. Однако на клеточной поверхности в любой отрезок времени имеется лишь около 10% всех рецепторов, большинство же рецепторов связано с гладкими мембранами аппарата Гольджи. Возможно, что эти мембраны служат предшественниками тех пузырьков, которые несут рецепторы к клеточной поверхности. Это необходимо для постоянного восполнения клеточных рецепторов, теряющихся в ходе эндоцитоза [74]. Было подсчитано, например, что вся популяция поверхностных рецепторов удаляется с клетки примерно через каждые 5—10 мин. Очевидно, что необходимо иметь значительное количество рецепторов внутри клетки для восполнения этих потерь. Восполнение рецепторов, вероятно, облегчается и тем обстоятельством, что рецепторы лизосом могут использоваться повторно. Это указывает на их устойчивость к действию лизосомных ферментов. Механизм защиты активных участков рецепторов, види-

мо, заключается в том, что в лизосомах они обращены внутрь, в сторону цитозоля. Вероятно, после слияния лизосом происходит изменение положения молекул рецептора в мембране. Для того чтобы рецепторы появились опять на поверхности клетки в правильном положении, необходимо новое изменение их ориентации в той мембранной системе, которая выводит их на поверхность. Механизм всего этого процесса в настоящее время еще не известен.

В печени млекопитающих гликопротеины крови в норме соприкасаются с поверхностными мембранами как гепатоцитов, так и непаренхиматозных клеток, выстилающих синусы. К последнему типу клеток относятся купферовы клетки, причем они играют важную роль в клиренсе гликопротеинов. Если орозомукоид обработать нейраминидазой, а затем β -галактозидазой для обнажения концевых остатков N-ацетилглюкозамина, то обработанный таким образом гликопротеин будет быстро поглощаться ретикулоэндотелиальной системой (рис. 4.11). Подобным образом удаляются гликопротеины с концевой маннозой, например многие ферменты лизосом крысы, в том числе β -глюкуронидаза и β -N-ацетилглюкозаминидаза, причем одновременное введение асиалоагалактоорозомукоида блокирует процесс выведения [75]. Необходи-

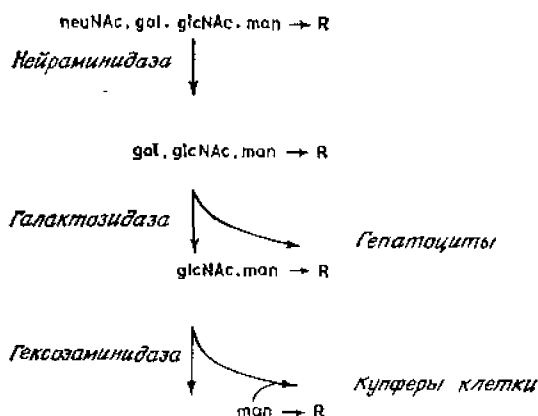


Рис. 4.11. Поглощение модифицированных гликопротеинов печенью млекопитающих. R — коровая область N-гликанов.

мо при этом иметь в виду, что N-гликаны ферментов лизосом богаты олигоманнозидными цепями. Следовательно, эти опыты дают основание думать, что распознающие молекулы на поверхности купферовых клеток связывают гликопротеины, имеющие в качестве концевых остатков N-ацетилглюкозамин или маннозу. Лектин широко распространен среди фагоцитирующих клеток, например альвеолярных макрофагов; он участвует во втором главном механизме катаболизма углеводов в тканях животных. Выделены компоненты, связывающие N-ацетилглюкозамин и маннозу, являющиеся, возможно, поверхностными лектинами непаразитарных клеток. В частности, подобный лектин был изолирован из печени крыс. Он оказался олигомерным гликопротеином, связанным с мембранами. Молекулярная масса одной его субъединицы равна 32 000. Антигенного родства с лектином гепатоцитов не обнаружено, но в обоих случаях для проявления активности необходимо присутствие ионов Ca^{2+} . Гликопротеины с концевой маннозой связывались несколько лучше, чем гликопротеины с концевым N-ацетилглюкозамином, что указывает на сходство специфичности лектина с таковой для конканавалина А [76]. Следует напомнить, что конканавалин А связывается с внутренними остатками маннозы, даже если они замещены другими сахарами, например N-ацетилглюкозамином при C-2, хотя сродство связывания выше с гликопротеинами, у которых концевые остатки маннозы не замещены (рис. 4.1).

Функция лектинов гепатоцитов и купферовых клеток может включать в себя и удаление из кровотока частично деградированных сывороточных гликопротеинов или лизосомных гидролаз. В частности, представляется очень важным выведение лизосомных ферментов, предотвращающих повреждение поверхности клеток, соприкасающихся с кровью. Однако лектины могут выполнять еще одну существенную задачу, а именно способствовать разрушению микроорганизмов, таких, как дрожжи, которые обладают большим количеством олигоманнозидных цепей. Переваривание дрожжей альвеолярными макрофагами, например, подавляется маннозой и гликопротеинами с концевыми остатками маннозы [77].

Гликопротеины крови птиц в отличие от таковых у млекопитающих имеют много обнаженных остатков галактозы. Поэтому следует ожидать, что рецепторная система в клетках печени птиц должна отличаться от таковой в гепатоцитах млекопитающих. Действительно, узнаваемым остатком у птиц является N-ацетилглюкозамин, и обработка гликопротеинов с концевыми остатками галактозы β -галактозидазой вызывает быстрое удаление таких модифицированных гликопротеинов из кровотока. Такой специфический лектин был выделен из печени кур. Он оказался гликопротеином, молекулярная масса субъединицы которого равна 26 000. Определение его полной аминокислотной последовательности показало, что ей присущи некоторые необычные характерные особенности. N-концевой остаток цепи ацетилирован. Участок, следующий за ним, т. е. участок цепи, включающий остатки 25—48, оказался богатым незаряженными аминокислотами, имеющими в основном гидрофобные боковые цепи. Возможно, что он участвует в прикреплении лектина к клеточной мембране. Противоположный конец пептидной цепи (карбоксильный), вероятно, обращен в межклеточное пространство и содержит один N-гликан, присоединенный к аспарагину-67. В этом же длинном участке пептидной цепи имеется семь остатков цистеина, и поэтому он, вероятно, сильно свернут. По-видимому, ориентация лектина печени кур в мембране противоположна той, которая имеется в случае гликофорина, и более сходна с гликопротеином «полосы 3», за тем лишь исключением, что полипептидная цепь лектина проходит через мембрану лишь один раз [78]. Пока локализация лектина у птиц еще неизвестна, однако маловероятно, что она аналогична локализации рецептора купферовых клеток млекопитающих, поскольку два этих белка различаются по молекулярной массе, потребности в катионах и углеводной специфичности. Так, после удаления сиаловой кислоты, галактозы и N-ацетилглюкозамина орозомукоид, имеющий после модификации высокое содержание концевых остатков маннозы, не связывается лектином птиц и не захватывается клетками. Из этого следует, что лектин птиц не распознает концевых остатков маннозы.

4.4.2. Клетки

Рецептор гепатоцитов млекопитающих, по-видимому, играет какую-то роль в определении судьбы не только растворимых сывороточных гликопротеинов, но и циркулирующих клеток, поскольку он способен агглютинировать эритроциты. Как было показано в гл. 2, мембрана эритроцитов человека содержит гликофорин — главный гликопротеин этих мембран, имеющий много концевых остатков сиаловой кислоты. Аналогичные белки обнаружены на поверхности эритроцитов большинства видов животных. Если радиоактивно меченные эритроциты обработать нейраминидазой и ввести в кровоток крыс, кроликов или собак, то радиоактивная метка, связанная с клетками, быстро исчезает из крови и появляется в печени или селезенке. В то же время необработанные клетки значительно более стабильны [79]. Однако имеющиеся данные противоречат тому, что один и тот же рецептор гепатоцитов участвует в удалении растворимых гликопротеинов и эритроцитов. Во-первых, обработка десилированных гликопротеинов (например, церулоплазмينا) галактозооксидазой для превращения атома C-6 концевых остатков в альдегидные группы препятствует исчезновению белков. Модифицированный белок присутствует в крови также длительно, как и контрольный белок, имеющий концевую сиаловую кислоту. По-видимому, рецептор гепатоцитов для асиалогликопротеинов требует наличия первичной гидроксильной группы при C-6. В противоположность этому обработка галактозооксидазой десилированных эритроцитов не увеличивает их короткого периода циркуляции. Во-вторых, десилированные эритроциты не связываются с изолированными гепатоцитами, но прочно связываются с купферовыми клетками и мононуклеарными клетками селезенки. Связывание с макрофагами подавляется галактозой. Это наводит на мысль о существовании еще одной системы, основанной на узнавании углеводов и участвующей в выведении десилированных эритроцитов. Эта система, по-видимому, отличается от рецептора гепатоцитов для гликопротеинов с концевой галактозой [80].

Все эти интересные данные можно однозначно объяснить наличием соответствующих специфичностей связывания у ингибируемых галактозой лектинов гепатоцитов и купферовых клеток. Главный сialiрированный гликопротеин мембран эритроцитов человека — гликофорин — отличается, например, от большинства сывороточных гликопротеинов наличием N-ацетилглюкозамина, связанного с центральным остатком β -маннозы в коровой области. Вероятно, эта особенность определяет способность десialiрированных эритроцитов поглощаться купферовыми клетками, а не гепатоцитами, хотя концевая галактоза является тем основным сахаром, который распознается обеими системами [81].

Необработанные эритроциты, взятые из нормального образца крови, постепенно удаляются из кровотока. У эритроцитов разного возраста обнаружены различия в строении углеводов. Так, более старые клетки имеют на 10—15% меньше сиаловой кислоты, чем вновь образованные. Как известно, все время происходит обновление эритроцитов, и вполне вероятно, что обсуждаемые опыты отражают тот механизм, с помощью которого регулируется жизненный цикл эритроцитов в кровотоке.

4.5. Адгезия клеток

4.5.1. Адгезия клетки к клетке

Адгезия клеток играет очень важную роль в формировании тканей и органов в процессе эмбриогенеза. При эмбриональном развитии происходит дифференцировка тотипотентных клеток, их сортировка в организованные скопления сходных клеток, транслокация клеток и окончательное формирование специализированных органов. Эти процессы зависят от специфического межклеточного узнавания и избирательной адгезии клеток. Классические опыты с клетками, взятыми от эмбрионов или дифференцированных органов (например, сердца, почек, печени и т. д.), указывают на то, что специфичность адгезии определяется самими дифференцированными клетками. Клетки, взятые из различных органов и спендированные затем вместе, обладают способностью

снова формировать агрегаты по *тканеспецифическому* принципу; так, клетки из ткани сердца в ходе агрегации исключают клетки печени.

Как уже указывалось, нарушение нормального процесса гликозилирования часто предотвращает развитие, в частности, у эмбрионов морского ежа или же у некоторых систем млекопитающих (например, почки). Поэтому гликопротеинам приписывается важная роль во многих взаимодействиях клеток, обуславливающих нормальное развитие.

Скорее всего адгезия клеток обусловлена реакцией между комплементарными молекулами. Такие взаимодействия могут быть следующих двух типов, если в них действительно участвуют углеводные компоненты гликопротеинов: 1) реакция между углеводными цепями, аналогичная взаимодействиям цепей многих линейных полисахаридов [4], и 2) реакция между углеводным компонентом и углеводсвязывающим белком, т. е. лектином. В последнее время второй возможности (рис. 4.12) отдается предпочтение, поскольку прямых взаимодействий между гликанами гликопротеинов не обнаружено. С другой стороны, сейчас обнаружены углеводсвязывающие белки необходимой специфичности и установлена их локализация на поверхности клетки. В ряде случаев эти белки появляются именно в то время, когда в ходе развития происходят определенные изменения, что подтверждает гипотезу о наличии белок-углеводных взаимодействий. Последнее, видимо, происходит между молекулами, интегрированными в мембраны клеточной поверхности реагирующих клеток (рис. 4.12, а). С другой стороны,

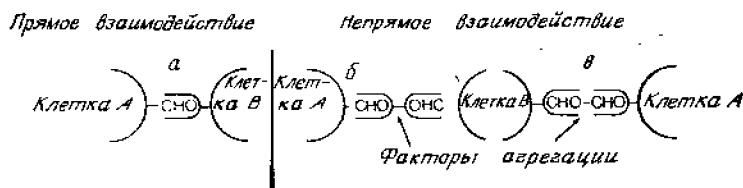


Рис. 4.12. Углевод-белковые взаимодействия при клеточной адгезии. СНО — углеводный компонент. — — участок, связывающий углевод.

возможно также участие в этих процессах факторов агрегации (рис. 4.12, б, в). Таковыми могут быть вещества, секретируемые в межклеточное пространство одной из взаимодействующих клеток или же клеткой, удаленной от места, где происходит адгезия клеток. Такая клетка, очевидно, может оказывать индуктивный ответ на агрегацию других клеток — явление, часто встречающееся в ходе дифференцировки.

Факторы агрегации были выделены из ряда тканей, в частности из морских губок — организма, у которого впервые были изучены специфические механизмы адгезии клеток. Еще в начале этого столетия Эдвард Уилсон (Wilson) показал, что губки диссоциируют на отдельные клетки, если их поместить в пресную воду, и вновь агрегируют после переноса в морскую воду. Этот эффект регулируется составом солей, в частности количеством кальция в морской воде. Если диссоциировать клетки двух разных губок, смешать их и проинкубировать в морской воде, то клетки каждой из них образуют отдельные агрегаты, в которых отсутствуют клетки другой губки. Данный феномен очень легко можно наблюдать, если смешать губки, имеющие различную окраску, обусловленную эндогенными хромофорами (например, губки с красными и зелеными клетками). При этом образуются красные или зеленые агрегаты, но не смешанные (рис. 4.13).

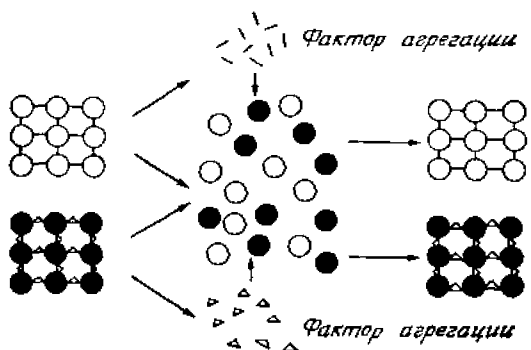


Рис. 4.13. Диссоциация и специфическая реагрегация клеток.

Факторы агрегации, высвобождаемые клетками губок при диссоциации, могут быть легко отделены от самих клеток методом центрифугирования. Они представляют собой гликопротеины с высокой молекулярной массой и имеют необычный состав [82]. Помимо галактозы, маннозы и N-ацетилгексозамина они содержат серную и уроновую кислоты. Последняя является важным компонентом, поскольку добавление свободной глюкуроновой кислоты подавляет агрегацию клеток в присутствии фактора агрегации. Установлено, что факторы агрегации обладают необходимой специфичностью; так, например, фактор губок *Microciona parthena* не способен вызывать агрегацию клеток у других, неродственных видов губок, например у *Haliclona*.

Сходная система обнаружена также у губок *Geodia cydonium*. Интересно, что частично очищенный фактор агрегации обладает глюкуронилтрансферазной активностью. Из этого вытекает, что превращение неагрегирующей системы в агрегирующую может происходить путем внеклеточного добавления остатков глюкуроновой кислоты, если, конечно, при этом будет иметься необходимое активированное производное сахара [83]. Из инкубационных сред культивируемых клеток высших организмов также были выделены факторы агрегации, например из первичных культур клеток сетчатки куриного эмбриона [84]. Этот фактор вызывает агрегацию клеток сетчатки, но не действует на клетки других тканей. Он представляет собой гликопротеин, содержащий моносахариды, характерные для N-гликанов. Другой фактор агрегации клеток секретируется культивируемыми асцитными клетками мышинной тератомы, причем его агрегирующая активность подавляется воздействием β -галактозидазой или добавлением свободной галактозы [85]. Очевидно, что остатки галактозы, содержащиеся в факторе агрегации, имеют весьма важное значение для инициирования клеточных взаимодействий в этой системе (рис. 4.12, а).

Другие доказательства участия гликопротеинов и галактозных остатков, в частности в клеточной адгезии, являются хотя и косвенными, но тем не менее весьма существенными. Отдельные клетки почек детенышей хо-

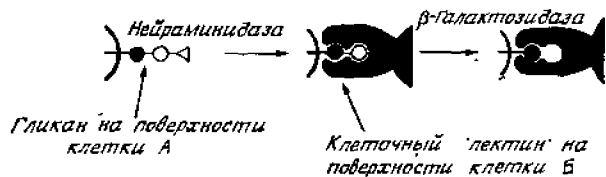


Рис. 4.14. Взаимодействие углеводов клеточной поверхности и белковых рецепторов при клеточной адгезии. Адгезия усиливается при обработке клеток нейраминидазой, которая обнажает дополнительный концевой остаток галактозы. Обработка β -галактозидазой снижает адгезию.

мячков (линия ВНК) легко образуют в суспензии агрегаты при наличии ионов кальция. Этот процесс стимулируется предварительной обработкой клеток нейраминидазой и блокируется обработкой галактозооксидазой, которая превращает гидроксильную группу при C-6 галактозы в альдегидную группу. Сходные результаты были получены и в опытах с другими клетками, причем в одном случае β -галактозидаза обуславливала значительное снижение скорости агрегации. Эти результаты указывают на существенную роль для адгезии сложных N-гликанов, имеющих следующую концевую последовательность: $\text{neuNAc. gal. glcNAc} \rightarrow \text{R}$, где R обозначает коровую область (рис. 4.14). Другие не прямые указания были получены при изучении адгезивных свойств уже упоминавшихся раньше ризин-резистентных мутантов (разд. 4.2.4) клеток почек детенышей хомячка (линия ВНК). Многие из резистентных линий клеток агрегируют плохо. Показано, что это явление связано с блокированием гликозилирования и со снижением количества поверхностных углеводов, связывающих ризин. Наконец, клетки способны прикрепляться к частицам агарозы, к которым присоединены ковалентно остатки галактозы, причем остатки других сахаров оказываются неэффективными [86].

Все эти данные, вместе взятые, указывают на наличие прямых взаимодействий (рис. 4.12, а) между углеводными цепями, богатыми галактозой и углеводсвязывающими белками, расположенными на поверхности находящихся рядом клеток (рис. 4.14). Первое предполо-

жение о природе белков, связывающих углеводы и участвующих в процессах адгезии, было выдвинуто Роземаном [87]. Он указал на очень высокую специфичность гликозилтрансфераз, которые поэтому являются очень вероятными кандидатами на участие в адгезивных взаимодействиях, идущих также с высокой степенью специфичности. Маловероятно, чтобы при нормальных условиях в межклеточном пространстве присутствовали активированные предшественники сахаров. Поэтому гликозилтрансферазы, будучи расположенными на клеточной поверхности, могли бы участвовать в стабильных взаимодействиях с соответствующими углеводными цепями, выполняющими роль акцепторов в реакциях, катализируемых этими ферментами. Такая модель имеет определенные преимущества, так как указывает, каким образом осуществляется контроль диссоциирования слипшихся клеток. Если активированные сахара достигают участков контакта между клетками, то перенос остатков сахара будет происходить с диссоциацией комплекса трансфераза — углевод. Первоначальные попытки обнаружить на поверхности клеток гликозилтрансферазы дали неоднозначные результаты и поэтому подверглись суровой критике. Однако недавно проведенные эксперименты подтверждают предположение о том, что поверхность некоторых клеток обладает сиалилтрансферазной активностью. Разумеется, еще предстоит доказать, что эти трансферазы действительно принимают участие в адгезии. Еще одна возможность основывается на том, что гликозидазы клеточной поверхности способны взаимодействовать с углеводными цепями прилегающих клеток не гидролитически. Лизосомные ферменты, имеющие относительно низкий оптимум pH, могут образовывать стабильные связи, поскольку pH среды вокруг клетки, видимо, значительно выше, чем значения pH в лизосомах, т. е. чем те, которые необходимы для оптимальной каталитической активности. Прямым доводом в пользу этой гипотезы служит обнаружение больших количеств лизосомных ферментов на поверхности клеток, а также тот факт, что такие клетки способны прилипать к инертной стеклянной поверхности, к которой прикреплены нейраминидаза, β -галактозидаза и α -маннозидаза. Эти опы-

ты еще нуждаются в дальнейшем подтверждении и обосновании.

Наиболее вероятными кандидатами на роль углеводсвязывающих молекул являются лектины, лишенные по имеющимся данным какой-либо ферментативной активности. Удалось выделить несколько таких лектинов. Например, у *Dictyostelium discoideum* появляется лектин в то время, когда одноклеточная амебовидная форма этого слизевика страдает от недостатка пищи. В этом случае клетки становятся способными образовывать агрегаты, которые затем дифференцируются в многоклеточные организмы, состоящие из стебелька и плодового тела с множеством спор. Выделенный лектин ингибирует N-ацетилглюкозамином, галактозой и D-фукозой, т. е. сахарами D-галактогипа. По-видимому, слизевик имеет по крайней мере два таких лектина, называемых дискоидинами (I и II). Сходные лектины (пурпурины, паллидины) обнаружены у других слизевиков — *Dictyostelium purpureum* и *Polyspondylium pallidum*. Все эти лектины имеют определенную специфичность по отношению к гомологичным организмам. В процессе агрегации, вероятно, участвуют углеводные цепи, последовательность которых специфична для каждого данного слизевика, и различные лектины обладают соответствующей способностью их узнавать, хотя простые галактозиды при высоких концентрациях могут тормозить агрегацию клеток. Очевидно, что именно эти сахара служат во всех случаях основной детерминантой. Дискоидины I и II и пурпурины появляются в различные периоды эмбрионального развития, свидетельствуя, очевидно, о том, что процесс развития сопровождается небольшими изменениями в строении углеводов поверхности, каждое из которых узнается соответствующим лектином, возникающим в определенном регулируемом порядке на поверхности клеток. Каждый из лектинов, возможно, необходим для нормального процесса развития, поскольку мутантные клетки *Dictyostelium discoideum*, не способные к агрегации, не имеют активных молекул дискоидина I, но в то же время обладают поверхностными рецепторами для дискоидинов, выделенных из нормальных организмов. Лектины слизевиков являются

олигомерными белками с субъединицами, молекулярная масса которых равна примерно 25 000 [89].

Из различных тканей млекопитающих и птиц выделены лектины другого класса. Молекулярная масса их ниже — около 13 000, а способность вызывать агглютинацию клеток подавляется галактозидами. В отсутствие восстанавливающих агентов субъединицы лектинов агрегируют, возможно, в результате образования дисульфидных связей и теряют при этом активность. Лектины не являются интегральными компонентами клеточных мембран, так как они солибилизируются при выдерживании тканей в растворах простых галактозидов, например в растворе лактозы. Следовательно, лектины — это такие факторы агрегации, которые действуют вне клетки, вызывая слипание последних путем реакции с соответствующими интегральными гликопротеинами мембран (рис. 4.12, б).

Существует несколько линий данных, свидетельствующих об участии этих галактозидсвязывающих лектинов в процессе дифференцировки. Лектин грудной мышцы цыпленка появляется между 8-м и 16-м днями эмбриональной жизни — в период активной дифференцировки мышц. В клетках миобластической линии (L6) активность лектина возрастает в ходе слияния миобластов в многотрубочки. Слиянию всегда предшествует адгезия клеток, и на поверхности миобластов с помощью иммуофлуоресценции был обнаружен лектин. Парадоксально, однако, что большая часть лектина находится внутри клеток. Возможно, что такая внутриклеточная локализация необходима для постоянного пополнения поверхностного лектина в ходе процесса слияния. С другой стороны, не исключено, что лектин может иметь несколько разных функций, причем некоторые из них связаны с транспортом гликопротеинов внутри клеток. В любом случае, однако, можно считать установленным факт специфического взаимодействия лектина с поверхностными остатками галактозы на начальных этапах дифференцировки мышц [89].

Еще один лектин имеется в эмбриональных поперечнополосатых мышцах цыпленка, причем его активность также меняется в ходе мышечного развития. Способ-

ность агглютинировать клетки сильно тормозится гепараном и гепарансульфатом, который является важной составной частью межклеточного матрикса. Лектин секретируется дифференцированными мышечными клетками в культуре во внеклеточное пространство и, возможно, играет более важную роль в прилипании клеток к поддерживающему матриксу (разд. 4.5.2), чем в адгезии клеток [89].

Процесс развития эритроцитов является другой интересной системой, в которой галактозоспецифические лектины также играют важную роль. Эритробласты имеют на своей поверхности типичный лектин с молекулярной массой 13 000, который способен склеивать эти клетки в «эритробластические островки», окружающие кормящий макрофаг. Количество лектина на клеточной поверхности снижается по мере созревания эритробластов и освобождения из агрегатов ретикулоцитов — прямых предшественников эритроцитов [90]. В ходе эритроидной дифференцировки происходят значительные изменения в галактозосодержащих углеводных цепях. По крайней мере это наблюдается в клетках человека — согласно данным, полученным с использованием реагентов, связывающихся с антигенными детерминантами Ii (гл. 3). Лектины, сходные с теми, которые расположены на поверхности эритробластов, способны реагировать с Ii -детерминантами [91]. Весьма интересно было бы обнаружить параллелизм между появлением лектина, связывающего галактозу, и модуляциями Ii -детерминант в развивающихся системах.

Наконец, следует упомянуть о галактозосвязывающем лектине, который освобождается из клеток мозга новорожденных крысят при добавлении лактозы. Он, очевидно, аналогичен другим упомянутым выше лектинам, также связывающим галактозу. Лектин из мозга появляется у 10-дневных крысят во время максимального образования синапсов, и возможно, что он играет важную роль, например в процессе синаптогенеза при развитии кортикального слоя [92].

4.5.2. Прикрепление клеток к субстрату

Все клетки, за исключением свободно циркулирующих (например, эритроцитов или циркулирующих, периферических лимфоцитов), окружены или погружены в слой вещества, богатого углеводами. Этот слой обозначают как *гликокалис*, *оболочка клеток*, или *внеклеточный матрикс*. Соединительные ткани, например хрящи или сухожилия, являются как бы крайним случаем такого высокодифференцированного бесклеточного матрикса, который откладывается в некоторых областях специализированными клетками, расположенными внутри его или в тесном с ним контакте. Внеклеточный матрикс защищает поверхность клеток (например, от повреждающих веществ), сохраняет буферный слой, компенсирующий внезапные изменения состава жидкости, омывающей клетки, и служит относительно жесткой структурой, поддерживающей форму тела. Кроме того, он играет важную роль в контроле клеточного роста и организации клеточных масс в ткани. Внеклеточный матрикс различается по своей тонкой структуре в зависимости от типа образующей его клетки. Однако главным компонентом является коллаген с варьирующим количеством протеогликанов и различных гликопротеинов. Гликопротеиновый компонент, по-видимому, играет важную роль в качестве посредника при адгезии клеток и межклеточного матрикса, в частности коллагена, и тем самым участвует в регуляции клеточного метаболизма и роста.

Всего насчитывается по крайней мере пять генетически детерминированных коллагенов, которые имеют свою характерную локализацию. Было обнаружено, что с каждым из них ассоциирован определенный тип клеток (табл. 4.2). К настоящему времени идентифицировано несколько гликопротеинов, определяющих прилипание клеток к коллагену (табл. 4.2). Эти факторы адгезии секретируются клетками, и по крайней мере некоторые из них, вероятно, имеют отдельные участки связывания для коллагена и для клеточной поверхности. Предпочтительная комбинация разных типов клеток и определенного коллагена, по-видимому, как раз и объясняется

Таблица 4.2. Коллагены и гликопротеины, способствующие адгезии клеток к коллагену

	Тип коллагена	Локализация	Адгезивный гликопротеин
Интерстициальный коллаген	I	Кожа, кости, сухожилья, деитии	Фиброкек-ткн
	II	Хрящи, межпозво-ночные диски	Хондроиек-тии
	III	Кожа плода, крове-носные сосуды, си-новальные мембра-ны	Фиброкек-тик
Коллагены базаль-ных мембран	IV	Базальные мембраны	Ламинин, зитактки
	AB или V	Гладкие мышцы, плацента, легкие	?

специфичностью участков связывания. Ряд обсуждаемых факторов присутствует также и в сыворотке, которую обычно добавляют в среду для культивирования клеток *in vitro*. Факторы эти могут пассивно адсорбироваться на пластиковой посуде для культур ткани, что способствует прикреплению к ней клеток без подстилающего слоя коллагена.

Адгезия клеток к коллагеновому субстрату или поверхности пластика включает три четко выраженных этапа: 1) связывание гликопротеинового фактора с поверхностью пластика или коллагена, 2) прикрепление клеток к фактору, присоединившемуся к поверхности, и

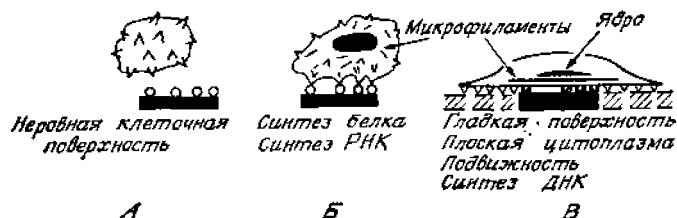


Рис. 4.15. Адгезия клетки к субстрату. А — гликопротеиновый фактор связывается с субстратом. Б — прикрепление клетки. В — рас-пластывание клетки.

3) умножение взаимодействий между поверхностью клеток и гликопротеиновыми молекулами и реорганизация внутриклеточного цитоскелета, в частности микрофиламентов, с распластыванием клеточной цитоплазмы по субстрату (рис. 4.15). Митотические клетки или клетки, освобожденные из монослойной культуры с помощью трипсина, представляют собой сферические частицы, поверхность которых покрыта многими складками, пузырьками и микроворсинками различной длины. Наиболее длинные ворсинки или филоподии первыми контактируют с субстратом и, очевидно, имеют на своих наружных концах поверхностно расположенные молекулы, которые способны обследовать соответствующий адгезивный субстрат, а затем с ним и взаимодействовать [93]. Филоподии богаты цитоплазматическими микрофиламентами, которые образуют пучки и плоские тяжи при растяжении клеток и затем взаимодействуют с другими компонентами цитоскелета, фиксируя стабильную структуру, характерную для прочно прикрепленной клетки.

Все этапы прикрепления клетки к субстрату проходят быстро (в течение 1—2 ч). Для этого процесса не требуется синтеза белка или нуклеиновых кислот *de novo*, однако необходимо присутствие двухвалентных катионов (Ca^{2+} и Mg^{2+}). При длительном культивировании добавление экзогенного фактора адгезии может оказаться ненужным, если сами клетки способны его образовывать и секретировать. Например, для прикрепления фибробластов к поверхности пластика или коллагена необходимо часа за два добавить фибронектин, однако уже через 12—16 ч эти клетки образуют достаточно фибронектина для собственной адгезии и в отсутствие экзогенного фибронектина. Добавление цитохалазина В, препятствующего полимеризации актина, тормозит прикрепление клеток, что указывает на определенную роль микрофиламентов в этом процессе.

а) *Фибронектин*. Из факторов, способствующих адгезии к коллагену, первым был обнаружен фибронектин (табл. 4.3) [94, 95]. Джон Эдсолл (Edsoll) и его сотрудники в 40-х годах выделили из крови белок, названный *холодным нерастворимым глобулином*, или *Cig*, так как он является основным компонентом в осадке, образу-

Таблица 4.3. Свойства фибронектина

Молекулярная масса	Примерно 450 000
Субъединичная структура	Димер (плазма) Димер и полимер (клетки)
Структура углеводов	4—5 N-г-лканы
Электрофоретическая подвижность	α_2 — β
Иммунохимически сходные формы	Плазма или клетки
Полипептидная структура	Имеются некоторые межвидовые различия
Продукт одного и того же гена в плазме и клетках?	Скорее всего продукты разных генов
Место синтеза	Фибробласты, астроглиальные клетки (источник плазматических форм?), ранние мезенхимальные клетки, макрофаги, тучные клетки
Связывающие домены	Коллагены, фибрин(оген), гепарин, актин, ДНК
Поперечное связывание	Рецепторы клеточной поверхности? Дисульфидные связи
Функции	Трансглютаминаза (фактор XIII) Способствуют адгезии и распластыванию клеток на коллагене, способствуют подвижности клеток, предотвращают дифференцировку хондроцитов, действуют как неспецифический опсонин в крови, стабилизируют свертывание крови

щаемся при свертывании крови на холоду. Позднее было показано, что фибронектин обладает свойством связывания фибриногена и фибрина. Именно этим и объясняется его присутствие в сгустке фибрина. В дальнейшем удалось выделить фибронектин из крови и тканей многих позвоночных, а также из культуральной среды и разных клеток млекопитающих и птиц, которые культивировались в монослое, в особенности из культур фибробластов. В интактных тканях фибронектин содержится прежде всего в фибриллах и в тесном контакте с коллагеном. Он присутствует в базальной пластинке, прилегающей как к слоям эпителиальных клеток, так и к рядом расположенной соединительной ткани, в строме лимфатической ткани и вокруг гладких мышечных клеток и поперечнополосатых мышечных волокон. В каких

именно клетках этих тканей образуется фибронектин, еще не совсем ясно. Однако кроме фибробластов в культуре ткани фибронектин синтезируется также миоцитами, астроглиальными клетками, эндотелиальными клетками, макрофагами, тучными и эпителиальными клетками, причем он часто накапливается в больших количествах в клеточном матриксе.

Циркулирующая форма молекулы фибронектина представляет собой димер, построенный из двух сходных, но не идентичных по размеру (одна несколько больше другой) и по строению субъединиц, связанных между собой дисульфидными мостиками. Молекулы, связанные с клетками, состоят из двух субъединиц, очень похожих по молекулярной массе (около 225 000) и могут быть полимеризованы путем образования множества дисульфидных связей. Димерную форму удается экстрагировать из клеток и клеточных секретов. Все эти разные формы фибронектина, по-видимому, очень сходны по своим генетическим, химическим и функциональным свойствам, но все же неидентичны. Упрощенная схема строения молекул фибронектина показана на рис. 4.16. Этот белок является гликопротеином, содержащим около четырех N-гликанов, которые по своей структуре сходны с таковыми у сывороточных гликопротеинов, например у орозомукоида. Углеводный компонент, вероятно, лишь кос-

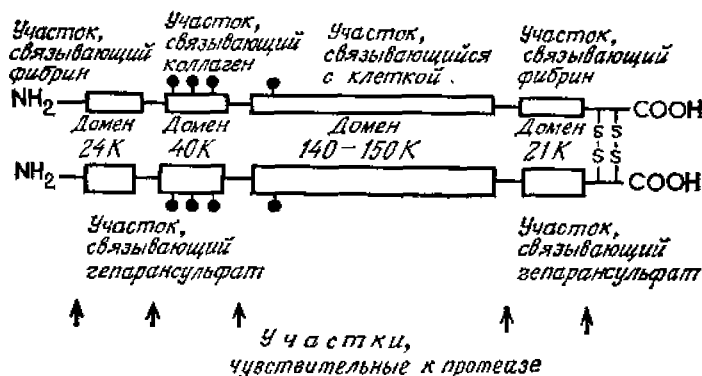


Рис. 4.16. Упрощенная схема строения фибронектина. Показаны участки ограниченного протеолиза и активные домены. ? — гликаны.

венно влияет на биологическую активность; возможно, он предохраняет молекулу от наружного протеолиза в ходе синтеза и секреции. Как было четко показано с помощью электронных микрофотографий [96], а также путем химического расщепления, димерные молекулы фибронектина состоят из функционально различных доменов, разделенных гибкими неглобулярными участками пептидной цепи, которые особенно чувствительны к протеолизу. Таким образом были получены активные фрагменты и показано, что они имеют различную биологическую активность. Так, фрагмент с молекулярной массой 40 000 (40K), связывающийся с коллагеном, расположен внутри молекулы, но вблизи от N-концевой части полипептидной цепи. Этот фрагмент, подобно молекуле интактного фибронектина, связывается с нативным фибриллярным коллагеном, в частности в ходе преципитации коллагеновых волокон [97]. Данная реакция лучше проходит с денатурированными коллагенами типа I—IV. Установлена определенная предпочтительность по отношению к интерстициальным коллагенам типа I и III при адгезии фибробластов. Участок полипептидной цепи коллагенов, к которому присоединяется 40K-домен фибронектина, представляет собой очень консервативную область, узнаваемую также коллагеназой млекопитающих. Еще в ранних исследованиях Стефен Хаушка (Haushka) показал, что дифференцировке миобластов в мышцу способствует этот же фрагмент коллагена. Поскольку фибронектин синтезируется миобластиками и в свою очередь способствует адгезии миобластов к коллагену, механизм данного процесса можно считать установленным.

Связь между фибронектином и коллагеном является относительно слабой и стабилизируется большим числом взаимодействий между каждой клеткой и субстратом. Так, например, клетки линии ВНК образуют около 50 000 таких контактов [86]. Кроме того, эти взаимодействия могут стабилизироваться секрецией прикрепленными клетками гепарансульфата — протеогликана, который обычно обнаруживается с нижней стороны клеток, связанных с субстратом. Основной участок фибронектина, ответственный за присоединение гепарансульфата, расположен вблизи коллагенсвязывающей области, но не перекрывается с ней.

Существует предположение, что компоненты плазматической мембраны участвуют в реакции присоединения к поверхности, покрытой фибронектином, и эта информация прямо или косвенно передается снаружи клетки в цитоплазму, вызывая реорганизацию микрофиламентов. С внутренней части плазматической мембраны расположены цитоплазматические белки, которые осаждают микрофиламенты или образуют «якорные» места для их прикрепления. В этом процессе принимают участие два белка: винкулин (молекулярная масса 130 000) и α -актинин (молекулярная масса 94 000). Антитела против винкулина окрашивают области нижней части прикрепленных к субстрату клеток, которые не всегда содержат фибронектин, тогда как α -актинин располагается вместе с молекулами фибронектина и, по-видимому, наиболее активно участвует в процессе распластывания клеток, который стимулируется поверхностью, покрытой фибронектином [98]. Однако пока еще истинная природа компонента (компонентов) плазматических мембран, взаимодействующих непосредственно с фибронектином, не установлена. Возможно, что в этом участвуют углеводные компоненты гликолипидов [94] или гликопротеинов [86, 99], при этом вполне возможно участие не одного, а нескольких факторов (рис. 4.17).

б) *Ламинин*. Хотя фибронектин может опосредовать прикрепление и распластывание многих типов клеток, он все же не во всех случаях эффективен. Одним из убедительных примеров может служить тот факт, что различные эпителиальные клетки способны прикрепляться и

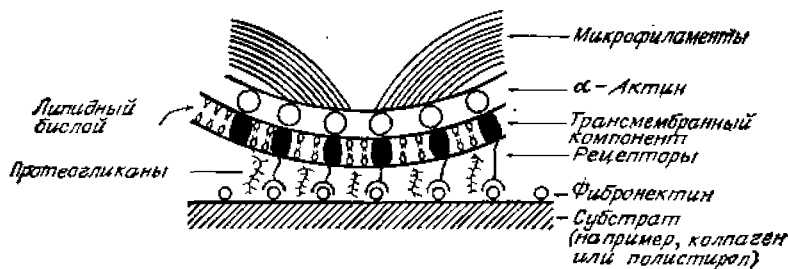


Рис. 4.17. Молекулы, участвующие в распластывании клеток.

распределяться по слою коллагена и в отсутствие фибронектина [94]. Еще один гликопротеин — ламинин ускоряет прикрепление таких клеток и, очевидно, является партнером фибронектина по действию на клетки эпителиального происхождения. Ламинин — это мультимерный гликопротеин с молекулярной массой 800 000, построенный из субъединиц с молекулярной массой 200 000 и 400 000. В отличие от фибронектина он обладает высокой специфичностью к клеткам, прикрепляющимся к коллагену типа IV, который присутствует в базальных мембранах и, как правило, в контакте с эпителиальными клетками организма. Ламинин образуется лишь клетками эпителиального происхождения. Однако и фибронектин может продуцироваться этими же клетками, и, по-видимому, он опосредует прикрепление *in vitro* некоторых эпителиальных клеток к интерстициальным коллагенам, тогда как ламинин участвует в их прикреплении к коллагену базальных мембран. Ламинин, подобно фибронектину, связывается с гепарином и гепарансульфатом [100]. Поскольку последний присутствует во многих базальных мембранах, такие взаимодействия могут играть определенную роль в организации матрикса и в адгезии к нему.

Недавно выделенные из базальных пластинок другие факторы, возможно, также участвуют в прикреплении клеток к коллагенам базальных мембран. Одним из них является энтактин, сульфатированный гликопротеин с молекулярной массой 158 000, который секретируется эндодермальными клетками в культуре и локализуется на основании клеток, обращенном в тканях к базальной мембране [101].

в) *Хондронектин*. Высокоспециализированные клетки — хондроциты также нуждаются в особом гликопротеиновом факторе для адгезии к коллагену (в данном случае к хрящевому коллагену типа II) [94]. Молекулярная масса хондронектина равна 180 000; подобно фибронектину, он присутствует в сыворотке, которая, следовательно, сама по себе может способствовать адгезии хондроцитов. Хондронектин специфически связывается с коллагеном типа II, содержащимся в хрящах. Интересно отметить, что хондроциты могут реагировать как с фиб-

ронектином, так и с хондронектином. Так, округлые клетки, прикрепленные хондронектином к коллагену типа II, могут быть с помощью фибронектина превращены в фибробластоподобную форму. Клетки затем прекращают образовывать коллаген, специфичный для хряща, а также протеогликаны и возвращаются к фибробластному фенотипу [102]. Поэтому в такой системе фибронектин подавляет специфическую дифференцировку клеток в культуре. Из этого, очевидно, следует, что образование фибронектина хондроцитами или другими клетками модулирует процесс развития ткани. Такая модуляция может иметь важное значение в образовании миогенных областей в хрящевых тканях и указывает на регулирующую роль поддерживающего матрикса в направлении роста клеток и их дифференцировки.

Из этого краткого обзора интенсивно развивающихся областей исследований можно представить себе, в чем состоят самые главные нерешенные проблемы, касающиеся функций гликопротеинов: 1) Какова роль гликопротеинов в регуляции организации межклеточного матрикса? 2) Способствует ли специфическая адгезия клеток, опосредуемая гликопротеинами, особым взаимоотношениям между дифференцированными типами клеток и специализированными внеклеточными матриксами? 3) Какие гликопротеины, гликолипиды или протеогликаны, связанные с клеточными поверхностями, участвуют в тесных контактах клеток и внеклеточного матрикса? 4) Каким путем такие взаимодействия способствуют, например, движению клеток по адгезивному матриксу или же миграции злокачественных клеток из первичного очага с последующей инфильтрацией и колонизацией в других областях межклеточного матрикса?

Как эти, так и другие вопросы, касающиеся гликопротеинов, подвергаются сейчас активному изучению и наряду с другими проблемами, обсуждаемыми в этой книге, свидетельствуют об очень большом интересе к строению и биосинтезу этих важных биологических макромолекул [103].

Приложение

Ниже кратко суммируются некоторые важные достижения, которые были опубликованы уже после завершения работы над рукописью книги.

В молекуле лютеинизирующего гормона овцы обнаружена ранее неизвестная углеводная последовательность, содержащая N-ацетилгалактозаминовый остаток, присоединенный гликозидной связью $\beta 1 \rightarrow 2$ к остатку маннозы, прикрепленному связью $\alpha 1 \rightarrow 6$ к маннозной коровой области $(\text{man})_3(\text{glcNAc})_2$ N-гликанов [104]. N-ацетилгалактозаминовый остаток имеет сульфатную группу. Это первый хорошо доказанный случай присутствия в N-гликанах β -связанных остатков N-ацетилгалактозамина (разд. 2.3). Весьма ценным добавлением к перечисленным в разд. 2.4 ферментам могут служить эндо- β -N-ацетилглюкозаминидазы широкого спектра действия, выделенные из *Flavobacter meningosepticum*. Они способны гидролизовать как олигосахариды, состоящие из остатков маннозы, так и сложные N-гликаны [105].

Не только в эритроцитах, но и в клетках других типов были обнаружены молекулы, подобные анкирину и спектрину [106—108], что, очевидно, свидетельствует о наличии у этих белков общей роли, заключающейся в связывании актиновой сети с другими элементами цитоскелета, например микротрубочками, и с мембранами (разд. 2.6.2).

Процесс сборки основного олигосахарид-липидного промежуточного продукта, рассмотренный в разд. 3.3.1, очевидно, имеет место и в случае молочной железы [109] и дрожжей [110]; непосредственный предшественник каждого остатка α -маннозы идентифицирован однозначно.

Выделена в очищенном виде глюкозидаза II-фермент, ответственный за удаление остатков глюкозы с $(1 \rightarrow 3)$ -связью в ходе процессинга N-гликанов [112] (разд. 3.3.2). На глюкозные звенья с $(1 \rightarrow 2)$ -связью он не действует. Для расщепления этих связей нужна другая специфическая глюкозидаза. В клетках лимфомы, резистентной к лектину, наблюдается недостаточность глюкозидазы II,

тогда как активность глюкозидазы I в этих же клетках не претерпевает существенных изменений [113]. Клетки способны накапливать гликопротеины, что подчеркивает важную роль гликозидаз в образовании «сложных» N-гликанов. «Поздняя» α -маннозидаза (или α -маннозидазы), которая участвует в процессинге продукта, образуемого при участии N-ацетилглюкозаминилтрансферазы I (разд. 3.3.3), сильно и специфически тормозится *свейнсоном* — алкалоидом, выделенным из одного австралийского растения [114]. На некоторые другие α -маннозидазы этот алкалоид не оказывает ингибирующего действия. Клетки, обработанные *свейнсоном*, не способны к образованию «сложных» N-гликанов [115], и скормливание упомянутого растения животным вызывает у них состояние, сходное с наследственной лизосомной болезнью накопления (маннозидоз, или лизосомная недостаточность α -маннозидаз), а также хроническое неврологическое заболевание — локоизм [116].

Сейчас идентифицированы две N-ацетилглюкозаминилтрансферазы, участвующие в сборке сильно разветвленных N-гликанов (разд. 3.3.3). Одна из них в больших количествах присутствует в яйцеводах кур [117]. Это — N-ацетилглюкозаминилтрансфераза III, которая обуславливает присоединение ($\beta 1 \rightarrow 4$)-связью N-ацетилглюкозаминильного остатка к коровой области, содержащей три остатка маннозы. Таким образом, становится понятным преобладание в овальбумине N-гликанов, содержащих эту связь (разд. 2.3.1). Этот фермент использует природный продукт, синтезируемый N-ацетилглюкозаминилтрансферазой I, т. е. $\text{glcNAc}(\text{man})_5$ (glcNAc)₂, или же продукт, синтезируемый N-ацетилглюкозаминилтрансферазой II. Это наблюдение помогает объяснить наличие во многих гликопротеинах, в том числе в овальбумине (рис. 2.6) и гликофрине (рис. 2.19), «сложных» N-гликанов, содержащих последовательность $\text{glcNAc}\beta 1 \rightarrow 4$ в коровой области. Присоединение звена $\text{glcNAc}\beta 1 \rightarrow 4$ к остатку β -маннозы в структуре $(\text{man})_5(\text{glcNAc})_2$ предотвращает процессинг до трехманнозной стадии, иначе говоря, препятствует образованию акцептора, необходимого для действия N-ацетилглюкозаминилтрансферазы II. Следовательно,

в ходе образования сложных N-гликанов, имеющих последовательность $\text{glcNAc}\beta 1 \rightarrow 4\text{man}\beta 1 \rightarrow 4\text{glcNAc}\beta 1 \rightarrow 4\text{glcNAc}$, действие глюкозаминилтрансферазы II должно предшествовать действию трансферазы III. Другой специфический фермент — N-ацетилглюкозаминилтрансфераза IV [118] участвует в присоединении остатка N-ацетилглюкозамина с помощью $(\beta 1 \rightarrow 4)$ -связи к остатку маннозы, соединенной $(\alpha 1 \rightarrow 3)$ -связью с коровой областью N-гликанов (рис. 2.6 и 2.11). Предпочтительным субстратом является последовательность коровой области $(\text{man})_3 (\text{glcNAc})_2$, у которой оба α -маннозильных звена замещены остатками $(\beta 1 \rightarrow 2)$ -связанного N-ацетилглюкозамина. Удаление звеньев N-ацетилглюкозамина от остатков маннозы, соединенных с β -маннозильным остатком $(\alpha 1 \rightarrow 6)$ -связью, значительно уменьшает ферментативную активность. Тот же эффект вызывает замещение галактозой любого остатка N-ацетилглюкозамина, имеющего связь $\beta 1 \rightarrow 2$. Поэтому субстратная специфичность этих ферментов (glcNAc трансфераз III и IV) подтверждает исключительную чувствительность гликозилтрансфераз по отношению к протяженным олигосахаридным последовательностям.

Токсин с необычными свойствами — *гелонин* был обнаружен в растении *Gelonium multiflorum* [119]. Гелонин, по-видимому, аналогичен токсической субъединице А рицина или абрина (разд. 4.2.3). При добавлении к интактным клеткам гелонин неэффективен, однако он высокотоксичен, будучи связанным с конканавалином А [119] или специфическим антителом к клеточному антигену Thy-1 [120]. Сейчас проявляется очень большой интерес к созданию таких *химерных токсинов*, состоящих из ферментативно активного компонента, выделенного из растительного или бактериального токсина и прикрепленного к другому компоненту, обладающему способностью к связыванию (например, к специфическому антителу или гормону). Возможно, что подобные химерные **токсины**, обладающие высокой клеточной специфичностью, могут быть использованы для избирательного удаления лишь нежелательных клеток, например опухолевых.

Установлена поверхностная локализация дискоидина

[121], что подтверждает предположение (разд. 4.5.1) об участии лектинов в адгезии клеток слизевиков. Дискоидины и паллидины не являются интегральными компонентами плазматической мембраны, но присоединяются к гликопротенновым рецепторам клеточной поверхности и тем самым связывают клетки друг с другом [122, 123], согласно модели, показанной на рис. 4.12, б. Рецепторы появляются на клеточной поверхности в ходе цикла развития, убедительно подтверждая, что агрегация клеток контролируется появлением на клеточной поверхности лектинов, что в свою очередь регулируется процессом развития.

Все больше накапливается данных о роли лектинов в адгезии бактерий к тканям животных. Этот процесс является необходимым первым этапом в ходе бактериальной колонизации и развития патологического состояния [124]. Многие грам-отрицательные бактерии, например *Escherichia coli*, имеют на своей поверхности выступы, на которых находятся лектины, связывающие маннозу. Адгезия этих бактерий к слизистым оболочкам может быть предотвращена или обращена добавлением простых маннозидов. Возможно, хотя твердо еще не установлено, что рецепторы этих бактериальных адгезинов представляют собой N-гликаны, содержащие остатки маннозы. В процессе адгезии других патогенных бактерий также участвуют углеводы. Например, бактерия *Streptococcus sanguis*, находящаяся в слюне, которая и вызывает кариес зубов и пародонтальные заболевания, связывается с гликопротенами, имеющими последовательность $\text{neuNAc}\alpha 2 \rightarrow 3\text{gal}\beta 1 \rightarrow 3\text{galNAc}$ и являющимися обычными компонентами муцинов слюны (разд. 2.5.1) [125]. Исследование механизма прикрепления бактерий может облегчить разработку эффективных вакцин и относительно простых (и дешевых) углеводных ингибиторов бактериальной колонизации и патогенности [126].

На возможную роль циркулирующего фибронектина (Cig) (разд. 4.5.2) в устранении обрывков соединительной ткани указывает тот факт [127], что частицы, покрытые желатиной, перевариваются фагоцитами только в присутствии фибронектина и гепарина.

Предположение о том, что циркулирующий фибронектин и связанный с клетками фибронектин являются продуктами разных генов (разд. 4.5.2), подтверждается наличием структурных различий между двумя белками, которые выявляются как химически, так и иммунологически с помощью моноклональных антител [128—130]. Следует отметить, однако, что домен фибронектина, ответственный за связывание с клетками, обнаруживается в небольшом протеолитическом фрагменте (молекулярная масса 12 000), первичная структура которого является, вероятно, высококонсервативной [131].

Литература

Такой сокращенный список литературы — вынужденная мера, так как необходимо упомянуть только самые важные сообщения. Цитируемые здесь статьи не всегда приоритетны, однако они обеспечивают необходимые сведения по обсуждаемой теме. С работами [1, 2] следует ознакомиться обязательно; работа [3] представляет интерес с точки зрения истории изучения гликопротеинов. Ссылки, отмеченные звездочками, рекомендуются для общего знакомства с вопросом.

1. Ehrlich P. Proc. Roy. Soc. B, London, **66**, 4246 (1900).
2. Morgan W.T.J. Proc. Roy. Soc. B. London, **151**, 308—347 (1960).
- *3. Gottschalk A., ed. Glycoproteins: their composition structure and function, Elsevier, Amsterdam (1972).
- *4. Rees D. A. Polysaccharide shapes, Chapman and Hall, London (1977).
- *5. Brown R. G., Kimmins W. C. International Review of Biochemistry II, Vol. 13: Plant Biochemistry (Northcote D. H., ed.), University Park Press, Baltimore, pp. 183—209 (1977).
6. Finne J., Krusius T., Margolis R. K., Margolis R. U. J. Biol. Chem., **254**, 10295—10300 (1979).
- *7. Montreuil J. Adv. Carb. Biochem., **37**, 157—223 (1979).
- *8. Kobata A. Analyt. Biochem., **100**, 1—4 (1979).
9. Huang C.-C., Mayer H. E., Montgomery R. Canb. Res., **13**, 127—137 (1970).
10. Narasimhan S., Harpaz N., Longmore G., Carver J.-P., Grey A. A., Schachter H. J. Biol. Chem., **255**, 4876—4884 (1980).
11. Longmore G. D., Schachter H. Carbohydr. Res., **100**, 365—392 (1982).
12. Takayasu T., Takahashi N., Shinoda T. Biochem Biophys Res. Commun., **97**, 635—641 (1980).
13. Chapman A., Kornfeld R. J. Biol. Chem., **254**, 816—828 (1979).
14. Fournet B., Montreuil J., Strecker G., Dorland L., Haverkamp J., Vliegthart F. G., Binette J. P., Schmid K. Biochemistry, **17**, 5206—5214 (1978).
15. Takahashi N., Nishibe H. Biochim. Biophys. Acta, **657**, 457—467 (1981).
16. Slomiany B. L., Murty V.L.N., Slomiany A. J. Biol. Chem., **255**, 9719—9723 (1980).
- *17. Hakomori S. I. Seminars in Hematology, **18**, 39—62 (1981).
- *18. Hughes R. C. Membrane glycoproteins: a review of structure and function, Butterworths, London (1976).
19. Furthmayr H., J. Supramol. Struct., **9**, 79—95 (1978).
20. Yoshida H., Furthmayr H., Kobata A. J. Biol. Chem., **255**, 9713—9718 (1980).
21. Fukuda M., Fukuda M. J. Supramol. Struct., **17**, 313—324 (1981).
- *22. Cappuccinelli P., Motility of living cells, Chapman and Hall, London (1980).

- *23. Parodi A. J., Leloir L. Trends Biochem. Sci., 4, 65—67 (1979).
- *24. Hughes R. C., Butters T. D. Trends Biochem. Sci., 6, 228—230 (1981).
- 25. Chapman A., Li E., Kornfeld S., J. Biol. Chem., 254, 10243—10249 (1979).
- 26. Spensre J. P., Elbein A. D. Proc. Nat. Acad. Sci., 77, 2524—2527 (1980).
- 27. Trowbridge I. S., Hyman R. Cell, 17, 503—508 (1979).
- 28. Bause E., FEBS Lett., 103, 296—270 (1979).
- 29. Hart G. W., Brew K., Grant G. A., Bradshaw R. A., Lennarz W. J. J. Biol. Chem., 254, 9747—9753 (1979).
- 30. Marshall R. D. Biochem. Soc. Symp., 40, 17—26 (1974).
- 31. Turco S. J., Stetson B., Robbin P. W. Proc. Nat. Acad. Sci., 74, 4411—4414 (1977).
- 32. Spiro R. G., Spiro M. J., Bhoyroo V. D. J. Biol. Chem., 254, 7659—7667 (1979).
- 33. Tabas I., Kornfeld S. J. Biol. Chem., 253, 7779—7786 (1978).
- 34. Li E., Kornfeld S. J. Biol. Chem., 254, 1600—1605 (1979).
- *35. Schachter H., Narasimhan S., Wilson J. R. In: Glycoproteins and Glycolipids in Disease Processes (Walborg E. J., ed.), American Chemical Society, Washington D. C., pp. 21—46 (1978).
- 36. Sheares B. T., Lau J. J. Y., Carlson D. M. J. Biol. Chem., 257, 599—602 (1982).
- 37. Fukuda M. N., Papermaster D. S., Hargrave P. A. J. Biol. Chem., 254, 8201—8207 (1979).
- 38. Paulson J. C., Prieels J. P., Glasgow L. R., Hill R. L. J. Biol. Chem., 253, 5617—5624 (1978).
- 39. Yamashita K., Tachibana Y., Nakayama T., Kitamura M., Endo Y., Kobata A. J. Biol. Chem., 255, 5635—5642 (1980).
- *40. Bailey A. J., Robbins S. P. Sci. Prog. Oxford, 63, 419—444 (1976).
- 41. Young J. D., Tsuchiya D., Sandlin D. E., Holroyde M. J. Biochemistry, 18, 4444—4448 (1979).
- 42. Williams D., Schachter H. J. Biol. Chem., 255, 11247—11252 (1980).
- 43. Sadler J. E., Rearick J. I., Paulson J. C., Hill R. L. J. Biol. Chem., 254, 4434—4443 (1979).
- 44. Bergh M. L. E., Hooghwinkel G. J. M., Etjnden D. H. van den Biochim. Biophys. Acta, 660, 161—169 (1981).
- 45. Berger E. G., Mandel T., Schilt V. J. Histochem. Cytochem., 29, 364—370 (1981).
- 46. Blobel C., Dobberstein B. J. Cell Biol., 67, 835—862 (1975).
- 47. Das R. C., Heath E. C. Proc. Nat. Acad. Sci., 77, 3811—3815 (1980).
- 48. Rothman J. E., Fine R. E. Proc. Nat. Acad. Sci., 77, 780—784 (1980).
- 49. Hanover J. A., Lennarz W. J., Young J. D. J. Biol. Chem., 255, 6713—6716 (1980).
- 50. Mills J. T., Adamany A. M. J. Biol. Chem., 253, 5270—5273 (1978).

51. Carson D. D., Lennarz W. J. *J. Biol. Chem.*, 256, 4679—4686 (1981).
52. Tavares I. A., Coolbear T., Hemming F. W. *Arch. Biochem. Biophys.*, 207, 427—436 (1981).
- *53. Watkins W. M. *Adv. Human Genetics*, 10, 1—136 (1980).
54. Crine P., Seidan N. G., Routhier R., Gossard F., Chretien M. *Eur. J. Biochem.*, 110, 387—396 (1980).
55. Sharon N., Lis H. In: *The Antigens* vol. 4 (Sela M., ed.) Academic Press, New York, pp. 429—463 (1977).
56. Baenziger J. U., Fiete D. *J. Biol. Chem.*, 254, 2400—24007 (1979).
- *57. Olsnes S., Pihl A. In: *Receptors and Recognitions BI: The specificity and action of animal, bacterial and plant toxins* (Cuatrecasas P., ed.), Chapman and Hall, London, pp. 129—173 (1976).
58. Baenziger J. U., Fiete D. *J. Biol. Chem.*, 254, 9795—9799 (1979).
59. Vischer P., Hughes R. C. *Eur. J. Biochem.*, 117, 275—284 (1981).
60. Hunt L. A. *J. Virol.*, 35, 362—370 (1980).
61. Chapman A., Fujimoto K., Kornfeld S. *J. Biol. Chem.*, 255, 4441—4446 (1980).
62. Trowbridge I. S., Hyman R. *Eur. J. Immunol.*, 8, 716—723 (1978).
63. Hercz A., Katona E., Cuitz E., Wilson I. R., Barton M. *Science*, 201, 1229—1232 (1978).
- *64. Neufeld E., Ashwell G. In: *The Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans* (Lennarz W. J., ed.), Plenum Press, New York, pp. 252—257 (1980).
65. Varki A., Kornfeld S. *J. Biol. Chem.*, 255, 10847—10858 (1980).
66. Fischer H. D., Gonzalez-Noriega A., Sly W. S. *J. Biol. Chem.*, 255, 5069—5074 (1980).
67. Reitman M. L., Kornfeld S. *J. Biol. Chem.*, 256, 4275—4281 (1981).
68. Waheed A., Pohlman R., Hasilik A., von Figura K. *J. Biol. Chem.*, 256, 4150—4152 (1981).
- *69. Dean R. T. *Cellular degradative processes*, Chapman and Hall, London (1978).
- *70. Ashwell G., Morell A. G. *Trends Biochem. Sci.*, 2, 76—78 (1977).
71. Baenziger J. U., Fiete D. *Cell*, 22, 611—620 (1980).
72. Hatton M. W. C., März L., Berry L. R., Debanne M. L., Regoezi E. *Biochem. J.*, 181, 633—638 (1979).
73. Stockert R. J., Gartner U., Morell A. C., Wolkoff A. W. *J. Biol. Chem.*, 255, 3008—3013 (1980).
75. Stahl P. O., Schlesinger P. H., Rodman J. S., Doebber T. *Nature*, 264, 86—88 (1976).
76. Mizuno Y., Isozutsuni Y., Kawasaki T., Yamashina I. *J. Biol. Chem.*, 256, 4247—4252 (1981).
77. Warr G. A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 93, 737—745 (1980).
78. Drickamer K. *J. Biol. Chem.*, 256, 5827—5839 (1981).
79. Aminoff D., Bell W. C., Vorder Bruegge W. G. In: *Cell Surface Carbohydrates and Biological Recognition* (Marchesi V. T.,

- Ginsburg V., Robbins P. W. and Fox C. F., eds), Alan R. Liss, New York, pp. 569—581 (1978).
80. Kolb H., Kolb-Bachofen V. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **85**, 678—683 (1978).
 81. Hildenbrandt, Aronson N. N. *Biochim. Biophys. Acta.*, **587**, 373—380 (1979).
 - *82. Burger M. M., Jumblatt J. In: *Cell and Tissue Interactions* (Lash J. W. and Burger M. M., eds), Raven Press, New York, pp. 155—172 (1977).
 83. Muller W. E. G., Zahn R. K., Kuretec B., Miller I., Uhlenbruch G. J. *Biol. Chem.*, **254**, 1280—1287 (1979).
 - *84. Moscona A. A., Hausman R. E. In: *Cell and Tissue Interactions* (Lash J. W. and Burger M. M., eds), Raven Press, New York, pp. 173—185 (1977).
 85. Oppenheimer S. B. *Exptl. Cell Res.*, **92**, 122—126 (1975).
 - *86. Hughes R. C., Pena S. D. J., Vischer P. In: *Cell Adhesion and Motility* (Curtis A. S. G. and Pitts J. D., eds), Cambridge University Press, pp. 329—356 (1979).
 - *87. Roseman S. *Chem. Phys. Lipids*, **5**, 270—278 (1970).
 88. Rauvala H., Hakomori S.-I. *J. Cell Biol.*, **88**, 149—159 (1981).
 - *89. Barondes S. H. In: *Cell Adhesion and Motility* (Curtis A. S. G. and Pitts J. D., eds), Cambridge University Press, pp. 309—324 (1980).
 90. Harrison F. I., Chesterton C. J. *Nature*, **286**, 502—504 (1980).
 91. Childs R. A., Feizi T. *FEBS Lett.*, **99**, 175—179 (1979).
 92. Simpson D. L., Thorne D. R., Loh H. H. *Nature*, **266**, 367—369 (1977).
 - *93. Crinnell F. *Int. Rev. Cytol.*, **58**, 65—144 (1978).
 - *94. Kleinman H. K., Klebe R. J., Martin G. R. *J. Cell Biol.*, **88**, 473—485 (1981).
 - *95. Ruoslahti E., Engvall E., Itayman E. *Coll. Res.*, **1**, 95—128 (1981).
 96. Engel J., Odermatt E., Engel A., Madri J. A., Furthmayr H., Rhode H., Timpl R. *J. Mol. Biol.*, **150**, 97—120 (1981).
 97. Kleinman H. K., Wilkes C. M., Martin G. R. *Biochemistry*, **20**, 2325—2330 (1981).
 98. Chen W. T., Singer S. J. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **77**, 7318—7322 (1980).
 99. Aplin R. C., Hughes R. C., Jaffe C. L., Sharon N. *Exptl. Cell Res.*, **134**, 488—494 (1981).
 100. Sakashita S., Engvall E., Ruoslahti E. *FEBS Lett.*, **116**, 243—246 (1980).
 101. Carlin B., Jaffe R., Bender B., Chung A. E. *J. Biol. Chem.*, **256**, 5209—5214 (1981).
 102. West C., Lanza W. R., Rosenbloom J., Lowe M., Holtzer H., Avdopoulos N. *Cell*, **17**, 491—501 (1979).
 - *103. Hughes R. C., Pena S. D. J. In: *Carbohydrate Metabolism and Its Disorders*, vol. 3 (Randle P. J., Steiner D. F. and Whelan W. H., eds), Academic Press, New York, pp. 363—423 (1981).

104. *Bedi G. S., French W. C., Bahl O. J. Biol. Chem., 257, 4345—4355 (1982).*
105. *Elder J. H., Alexander S. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 4540—4544 (1982).*
106. *Bennett V., Davis J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 7550—7554 (1981).*
107. *Bennett V., Davis J., Fowler W. E. Nature, 299, 126—130 (1982).*
108. *Glenney J., Glenney P., Weber K. Cell, 28, 843—854 (1982).*
109. *Vijay I. K., Perdew G. H. Eur. J. Biochem., 126, 167—172 (1982).*
110. *Prakash C., Vijay I. K. Biochemistry, 21, 4810—4818 (1982).*
111. *Rearick J. I., Fujimoto K., Kornfeld S. J. Biol. Chem., 256, 3762—3769 (1981).*
112. *Burns D. M., Touster O. J. Biol. Chem., 257, 9991—10000 (1982).*
113. *Reitman M. L., Trowbridge I. S., Kornfeld S. J. Biol. Chem., 257, 10357—10363 (1982).*
114. *Tulsiani D. R. P., Harris T. M., Touster O. J. Biol. Chem., 257, 7936—7939 (1982).*
115. *Elbein A. D., Borling P., Vosveck K., Horisberger M. J. Biol. Chem., 257, 1573—1576 (1982).*
116. *Molyneaux R. I., James L. F. Science, 216, 190—191 (1982).*
117. *Narasimhan S. J. Biol. Chem., 257, 10235—10242 (1982).*
118. *Gleeson P., Vella G., Narasimhan S., Schachter H. Fed. Proc. 41, 1147 (1982).*
119. *Stirpe F., Olsnes S., Pihl A. J. Biol. Chem., 255, 6947—6953 (1980).*
120. *Thorpe P. E., Brown A. N. F., Ross W. C. J., Cumber A. J., Detre S. I., Edwards D. S., Davies A. S. J., Stirpe F. Eur. J. Biochem., 116, 447—454 (1981).*
121. *Madley I. C., Cook M. J., Hames B. D. Biochem. J., 204, 787—794 (1982).*
122. *Ray J., Lerner R. A. Cell, 28, 91—98 (1982).*
123. *Drake D. K., Rosen S. D. J. Cell Biol., 93, 383—389 (1982).*
124. *Elliott K., O'Conner M., Whealan J. (eds.) CIBA Symposium 80. Adhesion and micro-organism pathogenicity, Pitman Medical, London (1982).*
125. *Muiray P. A., Levine M. J., Tabak L. A., Reddy M. S. Biochem. Biophys. Res. Commun., 106, 390—396 (1982).*
126. *Aronson M., Medalia O., Schori L., Mirelman D., Sharon N., Ofek I. J. Infect. Dis., 139, 329—332 (1979).*
127. *Van de Water L., Schroeder S., Crenshaw E. B., Hynes R. O. J. Cell Biol., 90, 32—39 (1981).*
128. *Fukunda M., Levery S. B., Hakomori S. I. J. Biol. Chem., 257, 6856—6860 (1982).*
129. *Hayashi M., Yamada K. M. J. Biol. Chem., 256, 11292—11300 (1981).*
130. *Atherton B. T., Hynes R. O. Cell, 25, 133—141 (1981).*
131. *Pierschbacher M. D., Ruoslahti E., Sundelin J., Lind P., Petersen P. A. J. Biol. Chem., 257, 9593—9597 (1982).*

Предметный указатель

- Абрии 89
 Агрегации факторы 108—109
 Агрегация губок 108—109
 Адгезия 106
 Анхирин 46, 47
 Актин 46, 47—48, 117, 121
 α -Актинин 121
 Амилаза 65
 Амфипатические молекулы 46
 Анионы, транспорт в эритроцитах 47. *См. также* «Белок «полосы 3» и «полосы 4.1»
 Антиген Thy-1 93
 Антигены группы крови 34, 36—41, 43, 78—80
 Арабиноза (ага) 12
 Арахис как источник лектина 83
 Асиалогликопротеины 99, 101. *См. также* Сиаловые кислоты, отщепление
 Асиалорозомуконид 99
 Асиалотрансферрин 99
 Аспарагин 12, 13, 18—19, 56—58
 Аффинная хроматография, очистка гликопротеинов 87
 N-Ацетилгалактозамин 14, 23, 100
 N-Ацетилглюкозамин 12—13, 18, 19, 21—22, 25, 54—55, 80, 103
 N-Ацетилглюкозаминилтрансферазы 29, 63—64, 66
 α -N-Ацетилглюкозаминил — фосфодиэстераза 97
 N-Ацетиллактозамин 22, 29
 N-Ацетиллейраминовая кислота 15
 Базальные мембраны 116, 122
 Белки, гликозилированные 56—59, 77, 93. *См. также* Гликопротеины, биосинтез
 Белок «полосы 3» и «полосы 4.1» 41—42, 46, 47, 78
 Бета-складчатые участки в белках 59
 Бомбейский фенотип по группе крови (Bombay) 38—39, 78—80
 Винкулин 121
 Виеклеточный матрикс 10, 114, 115, 122, 123
 Галактоза 10, 14, 23, 62, 69—70, 72, 99, 109—110
 UDP-Галактоза 51
 Галактозамин 10
 β -Галактозидаза 109, 110, 111
 Галактозооксидаза 98, 105, 110
 Гепаран 114
 Гепарансульфат 11, 114
 Гепаран 10
 Гепатоциты и их лектины 99—106
 Гидроксизин 12, 13
 Гликаны 9, 13
 — гибридные 21, 66, 86
 — коровья область 21, 22, 39, 64, 110

- Гликаны полигликозильные 83
— сложные 25, 29, 86, 87
Н-Гликаны 13, 60—61, 62, 65,
75, 99—100, 103
О-Гликаны 12, 13, 66—71, 75,
100
Гликоген 10
Гликозид 9
Гликозидаза(ы) 16. *См. также*
Экзогликозидазы, Эндогли-
козидазы
Гликозидная связь 12, 13
Гликозиламиновая связь 12
Гликозилирование белков 56—
59, 71—75, 77, 93
Гликозилтрансферазы 49, 73,
74, 78—81, 111
Гликокаликс 115. *См. также*
Внеклеточный матрикс
Гликоконъюгаты 11
Гликолипиды 10, 11, 15, 40, 49
Гликопептиды 14, 18—19, 21,
23, 25—26, 28, 87
Гликопротеины, биосинтез 49
— дрожжей, плесеней, расти-
тельный 14
— толстой кишки 37, 39
Гликофории 43—46, 47, 88, 105
Глюкоза (глюкопираноза) 7, 8,
10
— активация и перенос 49,
51—52
— роль в биосинтезе глика-
нов 55, 56. *См. также* Глю-
козосодержащие липиды
UDP-Глюкоза 51
Глюкозамин 10
Гликозидазы 61, 74, 111
Глюкозосодержащие липиды
59—60
Глюкуроновая кислота 10, 50,
109
UDP-Глюкуроновая кислота 51
Гольджи аппарат 72, 74—75,
95, 97
Гормон-чувствительные клетки
76
Гормоны (тропины) 82
Группы крови А, В, О 34, 36—
41, 78—80
— — MN 43
Дерматансульфат 11
Динодсалицилат лития 43
Дискоидины 112
Дифтерийный токсин 89
Долихилманиозилфосфат 53, 92
Долихол 52—53, 73, 76—77
Долихолфосфат(ы) 52—55,
76—77
Дрожжи 14, 52
Dictyostelium discoideum 112
Escherichia coli 30, 33, 41
Иммуноглобулины 22—27, 61,
76
I-клетки 94—96
I-клеточная болезнь 94
II-антигены 41—42, 114
Касторовые бобы как источ-
ник лектина 83
Кератансульфат 33
Кислые полисахариды соеди-
нительных тканей 11
Кислый α -гликопротеин *см.*
Орозомукоид
Кистозный фиброз 35
Кисты яичника секрет 39

- Клатрин 74
 Клеточная оболочка (оболочка клеток) 115. *См. также* Внеклеточный матрикс
 — стенка бактерий 52
 Клостридии, *Cl. perfringens* 16, 30
 Коллаген базальной мембраны 116
 — в гликокаликсе 115
 — и адгезия клеток 115—117, 120
 — — гликаны 9, 13, 14, 66
 — — фибронектин 120
 — интерстициальный 116, 122
 Компактин 77
 Конканавалин А 83, 85, 86—87, 91—92
 Купферовы клетки 103, 106

 β-Лактальбумин 57, 59, 80—81
 Лактоза 51, 80—81
 Лактозо-сиятаза 51
 Ламинин 116, 121—122
 Лектин из арахиса 83, 84
 — — проростков пшеницы 83, 85
 Лектины 83
 — биологическая роль 84, 99, 101, 103, 107, 112
 — млекопитающих 101, 113
 — птиц 104, 113
 — растительные 83
 — специфичность 84
 — токсичность 88
 Лимфоциты 76, 114
 Лизосомные ферменты 93—98, 111
 Лизосомы 74, 93—98
 Лизоцим 85

 Липидные промежуточные продукты 56, 75

 Манноза 14, 19, 21, 23, 54—56, 103. *См. также* Олигоманнозидные высокоманнозные структуры
 Маннозидазы 16, 17, 19, 61, 63, 111
 Маннозо-6-фосфат и лизосомные гидролазы 95—97
 Матрикс внеклеточный 10, 114, 115, 122, 123
 Мезалоновая кислота 76
 Мембрана плазматическая эндоплазматического ретикула — см. Эндоплазматический ретикулум
 — эритроцитов 43, 46—48, 105
 — эритроцитов 43, 46—48, 105
 Мембраны базальные 116, 122
 — клеток 10
 Миелин 67, 68
 Миелома, миеломные белки 23, 26—27
 Микрофиламенты 117
 Миотрубочки 113
 Моделин 89
 Моносахариды 7—11
 — присоединение к белкам 12—14, 49, 51
 Муцины 34—35. *См. также* Орозомукоид, Подчелюстной железы секрет
 Мышц развитие 113—114

 Нейраминаза 16, 17, 26, 105, 110, 111
 Нейраминные кислоты *см.* Сialовые кислоты

Нуклеотидсахара 49—51

Овальбумин 9, 18—22, 23, 25

— связывание с лектинами 86

Олигоманнозидные высокомолекулярные структуры 21

Олигосахариды 7—8

Орозомукоид (кислый α -гликопротеин) 17—18, 22, 27—29, 60, 65. *См. также* Асиало-орозомукоид

Пирофосфатазы 51

Подчелюстной железы секрет 35—36, 68—69

Полиглизозильные гликаны 42

Полиизопреноиды *см.* Долихол

Полисахариды 9

Пролин (Pro) 35, 68, 69

Протеогликаны 10, 11, 33

Процессинг 60—61, 64, 82, 96

Пурпурины 112

Рецепторы, восполнение 101—102

— самоагрегация 101

Рибонуклеазы 57, 58

Рицин 83, 87, 88, 91, 110

Родопсин 64

Rizobia 84

Секреты *см.* по названиям

— слизистые 36. *См. также* Муцины

Секреторные пузырьки 96

Секреция 92, 94

Серная кислота 109. *См. также* Сульфат

Спаллитрансферазы 65, 69—71

Сиаловые кислоты 15

— — активация 50, 51

— — отщепление 17, 28, 101.

См. также Асиалогликопротеины

— — присоединение к белкам 65, 69—71

Сигнальный пептид 73, 75

Синапсы, образование 114

Соединительная ткань 10, 94, 115

— — кислые полисахариды в ней 11

Спектрин 46, 47

Сульфат 10, 33. *См. также* Серная кислота

Streptococcus pneumoniae 16, 17, 18, 30, 33

Тиогликозидная связь 12

Трансферрин *см.* Асиалотрансферрин

Трипсин ингибитор 93

Туникамидин 71, 82, 92—93

Тэта-антиген *см.* Антиген Thy-1

Фетуин 45, 70—71

Фибрин 118

Фибриноген 118

Фибробласты 42, 94, 117—119

Фибронектин 117—121, 123

Фосфорилирование гликанов 74, 94—97

Фукоза (фукопираноза) 8, 10, 11, 50, 51, 62, 69—70

— в антигенах 38, 78—79

— — N-гликанах 27, 29, 64—65, 72

Фукозилтрансфераза(ы) 64—65, 69, 70, 79

- Flavobacter* 33
- Хитин 85
- Хитобиноза 21, 29, 45
- Холестерол 76—77
- Хондритинсульфат 11
- Хондронектин 116, 122—123
- Хрящ 116, 122—123
- Целлюлоза 9
- Церамид 10, 11
- Церулоплазмин 98
- Цитохалазин В 117
- Экзогликозидазы 16—17, 21
- Эктеинин 14
- Эмбрион куриный 109, 113
- морских ежей 77, 107
- Эмбриональное развитие 106, 112—113
- Эмульсин миндаля 30—32
- Эндогликозидазы 30—34
- Эндоплазматический ретикулум 72—75, 93, 95
- Энтактин 116, 122
- Эритроидная дифференцировка 114. *См. также* Эритроцитов развитие
- Эритроциты, антигены 38—42
- гликопротеины 41—42, 47—48
- мембрана 43, 46—48, 105
- развитие 42, 114
- циркуляция 105—106
- Ядерный магнитный резонанс (ЯМР) 14, 28

Оглавление

От переводчика	5
1. Введение	7
2. Строение	12
2.1. Связи углеводов с белком	12
2.2. Определение последовательности	14
2.2.1. Ферментативный анализ	15
2.3. Строение N-гликанов	18
2.3.1. Овальбумин	18
2.3.2. Иммуноглобулины	22
2.3.3. Орозомукоид	27
2.4. Эндогликозидазы	30
2.5. Строение O-гликанов	34
2.5.1. Секреты гликопротеиновой природы (муцины)	34
2.5.2. Антигены групп крови	37
2.6. Мембранные гликопротеины. Общие представления	42
2.6.1. Гликофорин	43
2.6.2. Мембраны эритроцитов	46
3. Биосинтез	49
3.1. Гликозилтрансферазы	49
3.2. Доноры	49
3.3. Сборка N-гликанов	52
3.3.1. Липиды-переносчики	52
3.3.2. Процессинг	60
3.3.3. Реакции терминирования	61
3.4. Сборка O-гликана	66
3.5. Локализация процесса гликозилирования в клетке	71
3.6. Контроль за биосинтезом гликана	76
3.6.1. Метаболический контроль	76
3.6.2. Генетический контроль	78
3.6.3. Модуляторы гликозилтрансфераз	80
4. Функции	82
4.1. Процессинг полипептидов	82
4.2. Лектины: белки, связывающие углеводы	83
4.2.1. Общие свойства	83
4.2.2. Специфичность	84
4.2.3. Токсические лектины	88
4.2.4. Клетки, резистентные к лектину	90
4.3. Внутриклеточный транспорт гликопротеинов	92
4.3.1. Блокирование гликозилирования	92
4.3.2. Цикл лизосомных ферментов	93
4.4. Катаболизм и клиренс	98
4.4.1. Растворимые гликопротеины	98
4.4.2. Клетки	105

4.5. Адгезия клеток	106
4.5.1. Адгезия клетки к клетке	106
4.5.2. Прикрепление клеток к субстрату	115
Приложение	124
Литература	129

УВАЖАЕМЫИ ЧИТАТЕЛЫ

Ваши замечания о содержании книги, ее оформлении, качестве перевода и другие просим присылать по адресу:

129820, Москва, И-110, ГСП, 1-й Рижский пер., д. 2,
издательство «Мир».

Р. Хьюз

ГЛИКОПРОТЕИНЫ

Ст. научн. редактор Л. Г. Тер-Саркисян
Мл. редактор Н. Ю. Плавинская
Художник И. Б. Кравцов
Художественный редактор А. Мусия
Технический редактор Л. П. Бирюкова
Корректор М. А. Смирнов

ИБ № 5153

Сдано в набор 07.02.84.

Подписано к печати 18.07.84.

Формат 84×108 $\frac{1}{2}$.

Бумага типографская № 2.

Гарнитура литерат. Печать высокая.

Объем 2,25 бум. л. Усл. печ. л. 7,56.

Усл. кр.-отт. 7,88. Уч.-изд. л. 7,38. Изд. № 4/3384.

Тираж 3 800 экз. Зак. 127. Цена 85 коп.

ИЗДАТЕЛЬСТВО «МИР»

129820, Москва, И-110, ГСП, 1-й Рижский пер., 2.

Ярославский полиграфкомбинат Союзполиграф-
прома при Государственном комитете СССР
по делам издательств, полиграфии и книжной
торговли. 150014, Ярославль, ул. Свободы, 97.